

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/038018 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09,
15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10,
5/06, C12Q 1/02, G01N 33/48, 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013420

(22) 国際出願日: 2003年10月21日 (21.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-307573
2002年10月22日 (22.10.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 皆木 康子 (MINAKI,Yasuko) [JP/JP]; 〒606-0806 京都府京都市左京区下鴨夢倉町19-3 中川方 Kyoto (JP). 尾野 雄一 (ONO,Yuichi) [JP/JP]; 〒567-0041 大阪府茨木市下穂積1-2-30-403 Osaka (JP). 坂本 佳正 (SAKAMOTO,Yoshimasa) [JP/JP]; 〒615-0813 京都府京都市右京区西京極町13番地 ラセットアベニュー707 Kyoto (JP). 水原 英理 (MIZUHARA,Eri) [JP/JP]; 〒639-1054 奈良県大和郡山市新町305-7 Nara (JP). 中谷 智哉 (NAKATANI,Tomoya) [JP/JP];

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CII, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

WO 2004/038018 A1

(54) Title: GENE EXPRESSED SPECIFICALLY IN DOPAMINE-PRODUCING NEURON PRECURSOR CELLS AFTER TERMINATION OF DIVISION

(54) 発明の名称: 分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現している遺伝子

(57) Abstract: A novel gene 65B13 which is expressed specifically and transiently in dopamine-producing neuron precursor cells immediately after the termination of division. Using the expression of the above 65B13 in cells as an indication, it becomes possible to select cells appropriate for transplantation therapy for neurodegenerative diseases including Parkinson's disease from the viewpoints of safety, survival rate and network formation.

(57) 要約: 本発明により、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する新規遺伝子65B13が得られた。細胞における該65B13の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。

- 1 -

明細書

分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現している遺伝子

5 技術分野

本発明は、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンにおいて発現している新規遺伝子 65B13 に関する。該遺伝子の発現を検出することにより、パーキンソン病 (PD) 等の神経変性疾患の移植治療において用いられるドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することができる。

10

背景技術

ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である (HARRISON' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 第 2 卷 第 23 版, Isselbacher et al. 編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp. 227 5-7)。治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うために L-DOPA (3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン) を経口投与する方法が主として行われているが、効果の持続性が良くないことが知られている。

20

最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む 6~9 週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている (米国特許第 5690927 号; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Loz

- 2 -

ano et al. (1997) *Transp. Proc.* 29: 977-80)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstain (1995) *Exp. Neurol.* 33: 106; Turner et al. (1993) *Neurosurg.* 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) *Transp. Proc.* 29: 977-80; 5 Widner and Brudin (1988) *Brain Res. Rev.* 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) *Exp. Neurol.* 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法等も提案されている(例えば、特表平10-508487号公報; 10 特表平10-508488号公報;特表平10-509034号公報参照)。この方法においては、細胞表面上の抗原(MHC クラス I 抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES)細胞、骨髓間質細胞などの非神経系細胞からの *in vitro* におけるドーパミン産生ニューロンの分化系の利用が有望視されている。将来的には ES 細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増していくものと思われる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セルトーリ細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特表平11-509170号公報;特表平11-501818号公報;Selawry and Cameron (1993) *Cell Transplant* 2: 123-9)。MHC がマッチする血縁者、他人の骨髓、骨髓バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も解決することができる。

その他、問題となるのは、ニューロン前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(Lindvall et al. (1989) *Arch. Neurol.* 46: 615-31 ; Wi

- 3 -

dner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63)、ヒト胎児神経由來の不死化セルライン(特表平 8-509215 号公報；特表平 11-506930 号公報；特表 2002-522 070 号公報)、NT2Z 細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特表平 9-5050554 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)、ドーパミン等のカテコールアミンを產生するように外来遺伝子によりトランスフェクトされた細胞、骨髓ストロマ細胞(特表 2002-504503 号公報；特表 2002-513545 号公報)等が挙げられる。しかしながらいずれも、ドーパミン產生ニューロンまたはドーパミン產生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

未分化な細胞集団からドーパミン產生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン產生ニューロンで発現するチロシンヒドロキシラーゼ等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン產生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特開 2002-51775 号公報)が提案されている。この方法は、外来遺伝子の導入という工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面からも問題である。

発明の開示

現時点での PD 移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域あるいは *in vitro* で分化誘導したドーパミン產生ニューロン前駆細胞は、いずれも多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましく、また腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存や、正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得

ると期待される。そこで、本発明者は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5 マウス中脳腹側と背側の RNA を用いてサブトラクション法(N-RDA; representation 5 al difference analysis 法; RDA 法(Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7) を改良(「DNA 断片の量の均一化方法及びサブストラクション法」特願 2001-18475 7 (出願日 2001/6/19))により発現に差のある遺伝子を増幅し、増幅された遺伝子の配列解析を行った。その結果、新規遺伝子として 65B13 が得られた。該遺伝子の全長配列を RACE 法により決定した結果、2 つのアルタナティブアイソフォーム 10 が得られ、各々、65B13-a 及び 65B13-b と名付けた。夫々の塩基配列を配列番号: 1 及び 2 として、そして、各塩基配列によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号: 3 及び 4 として記載する(図 1~4)。

そして、これらの遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果と、脊髄における増殖マーカーである Ki67 及び成熟マーカーである N 15 CAM と比較した結果得られた発現パターンから、65B13 は分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現するものと考えられた。さらに、中脳での発現をドーパミン産生ニューロンのマーカー遺伝子であるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH) の発現と比較したところ背-腹軸方向での発現領域が完全に一致しており、65B13 は、中脳では分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞 20 に特異的、且つ一過性に発現すると考えられた(図 10 及び 11)。

また、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果は、抗 65B13 抗体を用いる免疫染色により裏付けられた(図 13)。さらに、抗 65B13 抗体を用いたフローサイトメトリーにより 65B13 発現細胞の集団を効率的に分離することができた(図 14)。

上述の結果から、抗 65B13 抗体を用いることにより、中脳腹側領域または *in vitro* 25 で分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養培地から、65B13 発現細胞を分離することにより純粋な初期のドーパミンニューロン前駆細胞を得ること

とができるものと考えられる。そして、このようにして得られた細胞は、分裂停止後の前駆細胞のみが分離されたものであり、且つ目的の細胞種のみが分離されていることから、移植治療に用いた場合であっても安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞が用いられることから生存率、ネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。また、分裂直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果が得られず、細胞を成熟した状態で利用することが求められる場合であっても、本方法により得られた初期の前駆細胞を *in vitro* で最適な分化段階へ培養により成熟させればよいことから、目的とする移植治療に適した分化段階の材料を容易に調製することが可能となる(図 12)。

さらに、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞及び前駆細胞からニューロンまでの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD 治療のターゲット探索等にも有効である。また、本発明の方法により、最も初期の前駆細胞が得られることから、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、成熟を指標としてスクリーニング系等へ利用することもできる。

より具体的には、本発明は

[1] 分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B 13 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする以下の(1)～(4)のヌクレオチド配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

(1)配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(2)配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(3)配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列においてシグナル配列部分を欠く配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(4)配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のア

ミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(5) 上記(1)の配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、

5 [2] [1]記載のポリヌクレオチドを含むベクター、
[3] [1]記載のポリヌクレオチドまたは[2]記載のベクターを含む宿主細胞、
[4] [1]記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、
[5] [4]記載のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を有する
ポリペプチド断片、

10 [6] [4]記載のポリペプチド、または[5]記載のポリペプチド断片に対する抗体、
[7] [5]記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖、
[8] ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、[6]記載の抗体とドーパ
ミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工
程を含む方法、

15 [9] ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、[4]記載のポリペプチド
の少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前
駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、
[10] [8]または[9]記載の方法により選択された分裂停止直後のドーパミン産生
ニューロン前駆細胞、

20 [11] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパ
ミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、
[10]記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された
細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離す
る工程を含む方法、並びに

25 [12] 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、[10]記載の前駆細胞に対し、
被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を

検出する工程を含む方法、
に関する。

<ポリヌクレオチド>

5 本発明のポリヌクレオチドは、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する
のに用いることができる抗体を作成する際の抗原を遺伝子工学的手法により得る
際に使用することができる。本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドー
パミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチドをコード
する、配列番号:1(図 1 及び 2)の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2
10 (図 3 及び 4)の 127 番目から 2079 番目までの塩基を含む核酸配列、または該核酸
配列に相補的な配列を含むものである。

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ
核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノム DNA、
化学合成 DNA 及び RNA を含む。また、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチ
15 ジン、5-(カルボキシドロキシメチル)ウリジン、2' -0-メチルシチジン、5-カル
ボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル
ウリジン、ジヒドロウリジン、2' -0-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシ
ルキュエオシン、2' -0-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノ
シン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、
20 1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグ
アノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチ
ルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオ
ウリジン、 β -D-マンノシルキュエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオ
ウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチ
25 ルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- β -D-リボフラノシル-2-メチルリ
オプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-

6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5 オキシ酢酸、ワイブトキソシン、プソイドウリジン、キュエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-0-メチル-5-メチルウリジン、2'-0-メチルウリジン、ワイブトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチドをコードする、配列番号 3: 若しくは 4(各々図 1、2 若しくは図 3、4、または図 5 参照)記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。このようなアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号:1 及び 2 に記載された核酸配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1 及び 2 記載の配列とは異なる核酸配列を含むものである。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリペプチドを発現させるのに用いる場合、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 43-74)。本発明のポリヌクレオチドはまた、配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において、シグナル配列部分を欠く配列をコードする核酸配列を含むものを包含する。配列番号:3 及び 4 記載のアミノ酸配列では、最初の 17 アミノ酸残基がシグナル配列に該当する。

本発明のポリヌクレオチドは、さらに、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする、配列番号:3 若しくは 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元

のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dahlberg-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

5 ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持する必要がある場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列 10 を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。中でも、Ala、Val、Leu 及び Ile の間、Ser 及び Thr の間、Asp 及び Glu の間、Asn 及び Gln の間、Lys 及び Arg の間、Phe 及び Tyr の間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限されず、該ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸が 65B13 の抗原性を有していれば良い。

15

20

25 このような配列番号:3 または 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995)

- 10 -

Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

5 さらに、本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする、配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列または該核酸配列に相補的な配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、を含むポリヌクレオチドである。本発明の実施例では、配列番号:1 及び 2 記載の 2 種類の配列を有する 65B13 のアイソフォームが得られているが、その他にもアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体も本発明のポリペプチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、または配列番号:2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーション、サザンプロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNA ライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

20 より具体的に、cDNA ライブラリーの作製においては、まず、本発明のポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC 法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全 RNA を調製し、mRNA Purific

- 11 -

ation Kit (Pharmacia)等を用いて mRNA を精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)のような、直接 mRNA を調製するためのキットを利用してもよい。次に得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のような cDNA 合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNA は PCR を利用した 5' -RACE 法(Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高い cDNA ライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (199 10 7) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られた cDNA は、適当なベクター中に組み込む。

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、50°C」、「2×SSC、0.1% SDS、42°C」、「1×SSC、0.1% SDS、37°C」、よりストリンジエントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、65°C」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42°C」、「0.2×SSC、0.1% SDS、65°C」等の条件を挙げができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68°Cに保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1% SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS 中、37°Cで20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1% SDS 中、50°Cで20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37~5 20 5°Cで1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1% SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS 中、37°Cで20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、25 例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジエントな条件とすることができ

る。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を 60°C、さらにストリンジエントな条件としては 68°C とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、本発明の実施例において得られたマウス 65B13 のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。
5

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特に Section 9. 47-9. 58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特に Section 2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、または配列番号:2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列に対して少なくとも 50% 以上、好ましくは 7 15 0%、さらに好ましくは 80%、より一層好ましくは 90% (例えば、95% 以上、さらには 99%) の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLAST アルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムとして、アミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしては BLASTX、ヌクレオチド配列については BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等を参照することができる。

25 その他、遺伝子增幅技術(PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、65B13 のアイソフォームやア

- 13 -

レリック変異体等、65B13 と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、配列番号：1 及び 2 に記載のヌクレオチド配列を基にプライマーを設計し、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

5 例えば、BLAST サーチの結果、本発明のマウス 65B13 のヌクレオチド配列に対して 84% の同一性を有する 3 つの機能不明のヒト配列 (GenBank Accession No. : XM_048304, AL136654, BC007312; 各ヌクレオチド配列を配列番号: 5, 7, 9、また該ヌクレオチド配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号: 6, 8, 10 として記載する) は、マウス 65B13 に対するヒトホモログであると考えられる。このようなヒトホモログは、本発明の方法により、ヒトドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に使用することができる。これらの配列は、記録されている情報から、全て第 19 染色体上の同じ遺伝子由来の配列と考えられる。そのうち、配列番号: 7 に示す AL136654 と配列番号: 9 に示す BC007312 の 2 つは cDNA 断片であり、もう一つの配列番号: 5 に示す XM_048304 は、ゲノム配列から予測された mRNA 配列と考えられた。これらの予測配列には、本発明の 65B13 とほぼ同じ大きさの ORF があり、予測されたアミノ酸配列の 65B13 との同一性は 84% であった。

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法 (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により行うことができる。また、適当な DNA シークエンサーを利用して配列を解析することも可能である。

<ヌクレオチド鎖>

さらに、本発明により、本発明のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも 15 塩基からなるヌクレオチド鎖が提供される。ここで「相補的な配列」とは、ヌクレオチド配列中の少なくとも 15 個の連続した塩基が鋳型に対して完全に対になつ

ている場合のみならず、そのうちの少なくとも 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上(例えば、97% または 99%) が対になつているものも含む。対になつているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中の A に対し T(RNA の場合は U)、T または U に対し A、C に対し G、そして G に 5 対し C が対応して鎖が形成されていることを意味する。そして相同性は、上述のハイブリダイズするポリヌクレオチドの場合と同様の方法で決定することができる。

このような本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドを検出または単離するためのプローブ、增幅するためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には 15~100、好ましくは 15~35 個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも 15、好ましくは 30 個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3' 末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5' 末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。 10 本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。さらに、これらのプローブまたはプライマーを用いて、細胞内における本発明のポリヌクレオチドの変異を検出することができる。このような変異は、場合により本発明のポリペプチドの活性、または発現の異常を引き起こすものであることから、疾病の診断等に有用と考えられる。 15

また、本発明のヌクレオチド鎖には、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現を mRNA または DNA に対して結合することにより抑制するアンチセンス核酸、及び、mRNA を特異的に開裂することにより阻止するリボザイムが含まれる。

アンチセンスが標的遺伝子の発現抑制作用の機構としては、(1) 3 重鎖形成による転写開始阻害、(2) RNA ポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3) 合成中の RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、(4) イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によ

るスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リポソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347 (1993))。

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸としては、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、本発明のポリヌクレオチドを基に、ホスホチオエーテル法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスマールリボザイム(small ribozyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さら

- 16 -

に(1)グアノシンによる 5' -スプライス部位でのトランスエステル化反応を行う
グループ I イントロン RNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段
階反応で行うグループ II イントロン RNA、及び(3)加水分解反応による tRNA 前駆
体を 5' 側で切断するリボヌクレアーゼ P の RNA 成分に分類される。それに対し
5 て、スマールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp 程度)であり、RNA を切
断して、5' -ヒドロキシル基と 2' -3' 環状リン酸を生じさせる。スマールリボ
ザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、
ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucl
eic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが
10 含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知で
あり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くの RNA 配列と相補的と
なるように設計することにより、標的 RNA 中の塩基配列 UC、UU または UA を認識
して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al.
15 (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素 35: 21
91; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボ
ザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sa
saki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

20 本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞
内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、
アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リポソーム等を利用した非ウ
イルスベクター、または naked DNA として *ex vivo* 法または *in vivo* 法により遺
伝子治療に用いることもできる。

25 本発明のヌクレオチド鎖の塩基配列の確認は、上述のポリヌクレオチドと同様
の方法により行うことができる。

- 17 -

本発明により、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主細胞内に保持したり、該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを発現させたりするのに有用である。本ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。好ましい態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で本発明のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスクレベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアデニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。また、本発明のベクターは、好ましくは選択可能なマーカーを含む。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドは、天然において 65B13 に付加している 17 アミノ酸残基からなる、または異種蛋白質由来のシグナルペプチドであってもよい。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAG または TGA)の挿入を行ってもよい。

本発明のベクターは、好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、*in vitro* で、目的とする宿主細胞内で発現ベクター中にコードされるポリペプチドを発現することができる構築物を指す。クローニングベクター、バイナリーベクター、インテグレイティングベクター等が本発明の発現ベクターに含まれる。

発現の過程には、発現ベクター中のコード配列の翻訳可能な mRNA への転写、及び mRNA から本発明のポリペプチドへの翻訳、さらに場合によっては発現されたポリペプチドの小胞体内腔、ペリプラズムまたは細胞外への分泌が含まれる。

in vitro におけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST (Promega) を例示することができる。また、*E. coli* 等の原核細胞宿主における発現を可能にするプロモーターとしては P_L 、*araB* (Better et al. (1988) *Science* 240: 1041-3)、*lacZ* (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-6; Ward et al. (1992) *FASEB J.* 6: 2422-7)、*trp*、*tac*、*trc* (*lac* と *trp* の融合) 等のプロモーターが挙げられる。また、*trpA* 由来、ファージ由来、*rrnB* リボソーマル RNA 由来ターミネーターが、利用可能である。さらに、大腸菌用のベクターは、好ましくはベクターを宿主内で増幅するための「*ori*」、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つ。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。特に、ポリペプチドをペリプラズムへ分泌させることを目的とする場合、*pelB* シグナル配列 (Lei et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4379) を使用することができる。例えば、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pCR-Script、pGEX-5X-1 (Pharmacia)、pEGFP、pBluescript (Stratagene)、pET (Invitrogen; この場合の宿主は T7 ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい) 等のベクターを挙げることができる。また、特にサブクローニングまたは切出し用のベクターとしては、pGEM-T、pDIRECT、pT7 等を例示できる。

大腸菌以外の細菌宿主用としては、バチルス属のものが挙げられ、pUB110 系、pc194 系のベクターが例示される。より具体的に、枯草菌由来の pPL608、pKTH50 等を挙げることができる。その他、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas cepacia* 等のシュードモナス属、*Brevibacterium lactofermentum* 等のプレビバクテリウム属 (pAJ43 (Gene 39: 281 (1985)) 等)、*Corynebacterium glutamicum* 等のコリネバクテリウム属 (pCS11 (特開昭 57-183799 号公報); pCB101 (Mol. Gen. Genet. 196:

175 (1984))等)、ストレプトコッカス属(pHV1301(FEMS Microbiol. Lett. 26: 2
39 (1985))、pGK1(Appl. Environ. Microbiol. 50: 94 (1985))等)、ラクトバチ
ルス属(pAM β 1(J. Bacteiol. 137: 614 (1979))等)、*Rhodococcus rhodochrous*
等のロドコッカス属(J. Gen. Microbiol. 138: 1003 (1992))、*Streptomyces liv*
5 *idans*、*Streptomyces virginiae*等のストレプトマイセス属(Genetic Manipulat
ion of Streptomyces: A Laboratory Manual, Hopwood et al., Cold Spring Har
bor Laboratories (1985)参照;pIJ486(Mol. Gen. Genet. 203: 468-78 (1986))、
pKC1064(Gene 103: 97-9 (1991))、pUWL-KS(Gene 165: 149-50 (1995)))の細菌を
宿主とするベクター系が開発されている。微生物を宿主として利用できるベクタ
10 ーについては、『微生物学基礎講座 8 遺伝子工学』(共立出版)等の文献を参照す
ることができる。ベクターを細菌宿主へ導入するための手法としては、塩化カル
シウム法(Mandel and Higa (1970) J. Mol. Biol. 53: 158-62; HAnahan (1983)
J. Mol. Biol. 166: 557-80)、エレクトポレーション法等を採用することができ
る。

15 また、真核細胞宿主での発現を可能にする調節要素は、酵母を宿主とする場合
には、AOX1 及び GAL1 プロモーターが例示される。酵母由来の発現ベクターとし
ては、Pichia Expression Kit (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01 等が例示できる。
酵母で利用可能なベクターに関しては、Adv. Biochem. Eng. 43: 75-102 (1990)、
Yeast 8: 423-88 (1992)等に詳述されている。より具体的には、*Saccharomyces c*
20 *erevisiae*等のサッカロマイセス属では、YRp 系、YE_p 系、YCp 系、及び YIp 系ベ
クターが利用可能である。特に、多コピーの遺伝子導入が可能であり、安定に遺
伝子を保持できるインテグレーションベクター(EP537456 等)が有用である。その
他、*Kluyveromyces lactis*等のクルイベロマイセス属では、*S. cerevisiae*由来 2
μm 系ベクター、pKD1 系ベクター(J. Bacteriol. 145: 382-90 (1981))、pGK11
25 由来ベクター、クライベロマイセス自律増殖遺伝子 KARS 系ベクター等、シゾサッ
カロマイセス属では、Mol. Cell. Biol. 6: 80 (1986)に記載のベクター、pAUR22

- 2 0 -

4(宝酒造)、チゴサッカロマイセスでは pSB3 (Nucleic Acids Res. 13: 4267 (1985))由来ベクター、*Pichia angusta*、*Pichia pastoris* 等のピキア属では Yeast 7: 431-43 (1991)、Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985)、Nucleic Acids Res. 15: 3 859 (1987) 等の文献記載のベクター、*Candida maltosa*、*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. utilis* 等のキャンディダ属では、特開平 8-173170 号公報記載のベクター、また *C. maltosa* 由来の ARS (Agri. Biol. Chem. 51: 1587 (1987)) を利用したベクター、*Aspergillus niger*、*A. oryzae* 等のアスペルギルス属では、Trends in Biotechnology 7: 283-7 (1989) 記載のベクター、トリコデルマ属では菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーター (Bio/Technology 7: 596-603 (1989)) を利用したベクターが利用できる。

哺乳動物及びその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルス late プロモーター (Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAG プロモーター (Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate early プロモーター (Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター (Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TK プロモーター、SR α プロモーター (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40 プロモーター (Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 early プロモーター (Genetic Engineering Vol. 3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp. 83-141)、SV40 late プロモーター (Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV (ラウス肉腫ウイルス)-LTR プロモーター (Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTR プロモーター、CMV エンハンサー、SV40 エンハンサー、及びグロビンイントロン等を使用することができる。さらに、ネオマイシン、G418 等の薬剤による判別を可能とする薬剤耐性遺伝子がベクターに含まれていることが好ましい。そして、細胞内で遺伝子のコピー数の増加を計る場合には、例えば核酸合成経路を欠損した CHO を宿主とし、その欠損を補う DHFR 遺伝子を有する pCHOI 等のベク

ターを採用し、メトトレキセート(MTX)によりコピー数を増幅させることができる。一方、遺伝子の一過性発現のためには、SV40 の T 抗原遺伝子を染色体上に有する COS 細胞を宿主とし、pcD 等の SV40 の複製起点、またはアデノウイルス、ウシパピーローマウイルス(BPV)、ポリオーマウイルス等の複製開始点を持つベクターを 5 使用することができる。さらに、遺伝子コピー数の増幅のための選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)、チミジンキナーゼ(TK)、キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)等をコードする遺伝子を含んでもよい。適当なベクターとして、例えば、Okayama-Berg の発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pCDM8(Nature 329: 840-2 10 (1987))、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(Invitrogen)、pSPORT1(GIBCO BRL)、pSV2dhfr(Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCEP4(Invitrogen)、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13、pME18S(Mol. Cell. Biol. 8: 466-72 (1988))等が公知である。

特に動物の生体内において本発明のポリヌクレオチドを発現させるためには、p 15 Adex1cw 等のアデノウイルスベクター、pZIPneo 等のレトロウイルスベクターが挙げられる。ベクターはアデノウイルス法、エレクトポレーション(電気穿孔)法(Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法(カチオニックリポソーム DOTAP(Boehringer Mannheim)等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)法、内包型リポソーム(internal type liposome)法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987))、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAE デキストラン法、ウイルス-リポソーム法(別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』羊土社(1997);別冊実験医学『遺伝子導入&発現解析実験法』羊土社(1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 20

- 22 -

1806-13 (1997); *Circulation* 92 (Suppl. II): 479-82 (1995))、naked-DNAの直
接導入法等により宿主に導入することができる。アデノウイルス及びレトロウイ
ルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス、シンビスウイ
ルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイル
5 ルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス
等を元に作製されたベクターを利用することができる。生体内への投与は、*ex vi
vo* 法でも *in vivo* 法で行ってもよい。

その他、昆虫発現システムも異種ポリペプチドを発現させる系として知られて
おり、例えば、*Autographa californica*核ポリヘドロシスウイルス(AcNPV)をベク
10 ターとし、*Spodoptera frugiperda*細胞、または *Trichoplusia larvae*細胞中で
外来遺伝子を発現させることができる。この際、目的とする外来遺伝子は、ウイ
ルスの非必須領域にクローニングする。例えば、ポリヘドリンプロモーター制御
下に連結してもよい。この場合、ポリヘドリン遺伝子は不活性化され、コート蛋白
質を欠く組換えウイルスが產生され、該ウイルスに感染した *Spodoptera frugipe
15 rda* または *Trichoplusia larvae*等の細胞中で目的とするポリペプチドが発現さ
れる(Smith (1983) *J. Virol.* 46: 584; Engelhard (1994) *Proc. Natl. Acad. S
ci. USA* 91: 3224-7)。その他、昆虫細胞由来の発現ベクターとして、Bac-to-BAC
baculovirus expression system(Bigco BRL)、pBacPAK8 等も公知である。

20 植物細胞を宿主とする場合には、例えばカリフラワーモザイクウイルスの 35S
プロモーター等を利用したベクターが使用可能である。植物細胞へのベクターの
導入法としては、PEG 法、エレクトポーレーション法、アグロバクテリウム法、パ
ーティクルガン法等が公知である。

ベクターへの DNA の挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行
うことができる(*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons
25 (1987) Section 11.4-11.11; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd ed.,
Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

<宿主>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主が提供される。本発明のポリペプチドの製造には、*in vitro* 及び *in vivo* の產生系が考えられる。本発明の宿主には、古細菌、細菌、真菌類、植物、昆虫、魚類、両生類、5 ハ虫類、鳥類、哺乳類由来の原核及び真核細胞が含まれる。本発明の宿主は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものである。該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になければよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み10 込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

細菌宿主としては、*E. coli*(JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue)、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis* 等、エシェリシア属、ストレプトコッカス属、スタフ15 ィロコッカス属、セラチア属、バシリス属等に属するのグラム陽性及びグラム陰性細菌を例示することができる。

真核宿主には、酵母等の真菌類、高等植物(*Nicotiana tabacum* 由来細胞)、昆虫(ドロソフィラ S2、スプロドプテラ Sf9、Sf21、Tn5)、魚類、両生類(アフリカツメガエル卵母細胞(Valle et al. (1981) *Nature* 291: 358-40))、ハ虫類、鳥類、哺乳類(CHO (J. Exp. Med. 108: 945 (1995); 中でも DHFR 遺伝子欠損 dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980) 及び CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968)) が好適である)、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK2920 3、Bowes メラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT56 37(特開昭 63-299 号公報)、植物(ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、トマト、コムギ、オオムギ、ライ麦、アルファルファ、亜麻等)等の細胞が含まれる。真菌類としては、*Saccharomyces* 属に属する *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia* 属等の酵母に加えて、糸状菌の *Aspergillus* 属の *Aspergillus niger* 等の細胞を宿主とした発現系も公知である。

宿主細胞へのベクターの導入は、エレクトポレーション法(Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、5 リポフェクション(Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAE デキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、10 FuGene6 試薬(Boehringer-Mannheim)等により行い得る。

<ポリペプチド及びその断片>

本発明の「ポリペプチド」は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされる15 ペプチド重合体である。配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げることができる。本発明のポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GPI アンカー形成、架橋、 γ -カルボキシル化、環化、共有架橋の形成、グリコシル化、20 酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、シスチンの形成、ジスルフィド結合の形成、セレノイル化、脱メチル化、蛋白質の分解処理、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合化、ヒドロキシル化、ピログルタメートの形成、フ ラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノシトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユビキチン化、ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。さら25 に、本発明のポリペプチドにはシグナルペプチド部分がついた前駆体、シグナルペプチド部分を欠く成熟蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融

合蛋白質を含む。本発明のポリペプチドに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)、サブスタンス P、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His 等)、プロテイン C 断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc 断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Tehcnol. 6: 1204-10)、lck タグ、p18 HIV 断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T 抗原断片、T7-タグ(T7 gene10 蛋白質)、VSV-GP 断片(Vesicular stomatitis ウィルス糖蛋白質)等の蛋白質の精製を容易にする配列(例えば、pcDNA3.1/Myc-His(Invitrogen)のようなベクターを利用できる)、組換え技術により蛋白質を生産する際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

さらに、本発明により本発明のポリペプチドの断片が提供される。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも 8 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または 15 アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 α ヘリックス及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片が本発明のポリペプチド断片に含まれる。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認する PEPSCAN 法(特表昭 60-500684 号

公報)等により確認することができる。

本発明のポリペプチド、及びポリペプチド断片は公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することができる。遺伝子組換え技術により本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片を製造する場合、製造される蛋白質は、選択する宿主の種類によってグリコシル化を受ける場合と受けない場合、さらに分子量、等電点等が異なる場合がある。通常、大腸菌等の原核細胞を宿主としてポリペプチドを発現させた場合、得られるポリペプチドは本来ポリペプチドが有していた N-末端にメチオニン残基が付加された形で產生される。このような宿主の違いにより、構造の異なるポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

<ポリペプチドの製造>

in vitro でポリペプチドを製造する場合、*in vitro* トランスレーション (Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44) 等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず、上述の中から適当な宿主細胞を選択し、目的とする DNA による形質転換を行う。続いて形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DME 20 M (Virology 8: 396 (1959)、MEM (Science 122: 501 (1952))、RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199 (Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM 等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清 (FCS) 等の血清を添加し、pH 約 6~8、30~40°C において 15~200 時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

一方、*in vivo* におけるポリペプチドの生産系を確立するためには、動物または植物へ目的とする DNA を導入し、生体内においてポリペプチドを產生させる。

ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等の哺乳動物、カイコ等の昆虫(Susumu (1985) *Nature* 315: 592-4)等の動物系が公知である(Lubon (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4: 1-54)。また、哺乳動物系においてトランスジェニック動物を用いることもできる。

5 例えれば、所望のポリペプチドをヤギの乳汁中に分泌させることを目的とする場合、該ポリペプチドをコードするDNAを β カゼイン等の乳汁中に特異的分泌される蛋白質をコードするDNAと結合し、目的ポリペプチドを融合蛋白質として発現させるようにする。次に、融合蛋白質をコードするDNAをヤギの胚へ導入する。DNAを導入した胚を雌ヤギの子宮へ移植する。このヤギから生まれるトランスジェニックヤギ、またはその子孫は乳汁中に所望のポリペプチドを分泌する。必要に応じ、乳汁量を増やすため、ホルモンを投与することもできる(Ebert et al. (1994) *Bio/Technology* 12: 699-702)。

タバコ等の植物を用いたトランスジェニック植物のポリペプチド産生系が公知である。まず、所望のポリペプチドコードDNAをpMON530等の植物発現に適したベクターに組み込み、*Agrobacterium tumefaciens*等の細菌に導入する。DNAの導入された細菌を*Nicotina tabacum*等の植物に感染させ、植物を再生させることにより、所望のポリペプチドを得られたトランスジェニック植物の葉より単離することができる(Julian et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 131-8)。その他の方法としては、PEGを用いプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法(Gene Transfer to Plants, Potrykus and Spangenberg ed. (1995) pp. 66-74; インド型イネ品種に適する)、電気パルスによりプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法(Toki et al. (1992) *Plant Physiol.* 100: 1503-7; 日本型イネに適する)、パーティクルガン法で植物細胞に直接DNAを導入し植物体を再生する方法(Christou et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 957-62)、アグロバクテリウムを介し細胞にDNAを導入し植物体を再生する方法(Hiei et al. (1994) *Plant J.* 6:271-82)等が確立されている。植物を再生する方法については、Toki et al.

(1995) *Plant Physiol.* 100: 1503-7 を参照することができる。

トランスジェニック植物が一度得られた後は、さらに該植物の種子、果実、塊茎、塊根、株、切穂、カルス、プロトプラスト等を材料として同じように本発明のポリペプチドを産生する植物宿主を繁殖させ得ることができる。

5 通常、遺伝子組換え技術により製造された本発明のポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物を回収する。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、
10 溶媒沈殿、溶媒抽出、硫安またはエタノール沈殿等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、後述の本発明のポリペプチドに対する抗体、を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。また、GST との融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。本発明のポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa 等を使用して不要な部分を切断することもできる。さらに、必要に応じキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシリ

エンドペプチダーゼ等の酵素を用い得られたポリペプチドを修飾することも可能である。

本発明のポリペプチド断片は、上述の合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いて本発明のポリペプチドを切断して製造

5 することもできる。

<抗体>

本発明により、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFV) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol. 113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp. 269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 5 10 37-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')2、Fc、Fv 等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG 等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造され得、二次抗体を用いずに検出できるようにしてよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るよう改変されていてもよい。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として製造することができる。また、本発明のポリペプチド若しくはその断片のうち短いものは、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いて

もよい。また、本発明のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチドまたはその断片を所望

5 によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、靈長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の靈長目10 の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原を Phosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を 4~21 日毎に数回投与する。抗体の產生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、15 例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13) を参照することができる。

モノクローナル抗体を產生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞と20 ポリエチレンギリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milstein の方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞が挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は25 死滅するヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む培養液(HAT 培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポ

- 31 -

リペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を產生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照するこ

5 ともできる。

ハイブリドーマは、その他、最初に EB ウィルスに感染させたヒトリンパ球を *in vitro* で免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U2 66 等)と融合し、ヒト抗体を產生するハイブリドーマを得る方法(特開昭 63-17688 号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体產生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56 等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を產生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

15 また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK 参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体產生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を產生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

本発明の抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をペプシン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) *Methods Enzymol.* 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Lamoyi (1986) *Methods Enzymol.* 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) *Trends Biotechnol.* 9: 132-7 参照)。

本発明の多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) *Behring Inst. Mill.* 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髄腫細胞等の真核細胞発現系をトランسفエクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法(Zimmermann (1986) *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) *Int. J. Cancer* 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; EP404097; W093/11161 参照)。

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、<ポリペプチドの製造>の項で詳細に記載した蛋白質精製技術によつても行い得る(*Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephadex F.F. (Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法による測定の場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで本発明のポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフェオスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド及びその断片の精製に使用することができる。また、パーキンソン病等に対する細胞移植治療に好適に使用され得るドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得るために利用することもできる。

15

<ドーパミン産生ニューロンの選択方法>

本発明により分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択的に均一な集団として得る方法が提供された。より詳細には、本発明の 65B13 ポリペプチドに対する抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むことが予測される細胞試料とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することで本発明のポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を獲得できる(図 12 から 14 参照)。細胞との接触前に、抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに

対して添加することにより精製を行うことができる。

また、65B13 は Ig ドメインを持つ接着分子様の構造を有し(図 6 参照)、培養細胞中で発現させた場合、65B13 を発現させた細胞同士が接着することが判っている。65B13 を発現させていない細胞とは接着しないため、65B13 を介した接着はホモフィリックな結合であると考えられる。このような 65B13 ポリペプチドの性質から、65B13 ポリペプチドの特に細胞外領域部分を利用し、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる。例えば、適当な担体上に、65B13 ポリペプチドの細胞外領域部分を固定し、細胞と接触させることによりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を取得することが可能である。従って、本発明により、本発明のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロンを選択する方法が提供される。

本発明における分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離は、抗 65B13 抗体を用いたフローサイトメトリーにより効率的に行なうことができる(実施例 4、図 14)。

その他、65B13 に対するプロモーターを利用してドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる(例えば、特開 2002-51775 号公報参照)。例えば、後述する 65B13 の発現領域解析により得られたプロモーター部分に対し、GFP 等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、65B13 遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、または *in vitro* で分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養培地である。*in vitro* におけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知の ES 細胞、骨髓間質細胞、

神経由来の不死化セルライン(特表平 8-509215 号公報；特表平 11-506930 号公報；特表 2002-522070 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共に培養することにより分化させることができる。さらに、
5 線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細胞を誘導する方法も知られている(特表平 10-509319 号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告も成されている(特表 2002-530068 号公報)。本発明のドーパミン産生ニューロン
10 前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、如何なる方法により分離または培養された細胞群であってもよい。

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスピーブ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面
15 に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には特に制限はなく、膜状、纖維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

20 <ドーパミン産生ニューロン前駆細胞>

このようにして獲得された細胞は、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞であることから、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面で
25 PD 等の神経変性疾患の移植治療に好ましいものである。さらに、本方法により得られた本発明の細胞(群)は、分裂直後の前駆細胞であることから、*in vitro* において培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能で

あり、種々の神経移植治療の材料としても好ましいものである。本発明の方法により得られたニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、さらに好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個のニューロンを移植する。第1の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund 等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall 等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo 等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参考することができる。

さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD 治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

15 <遺伝子発現レベルの比較>

本発明の抗体を用いて得られた分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することができる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病的治療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化／誘導／増殖さ

れた細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞 *in situ* ハイブリダイゼーション、ノーザンプロットハイブリダイゼーション、RNA ドットプロットハイブリダイゼーション、逆転写 PCR、RNase 保護アッセイ、DNA マイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析(SAGE; serial analysis of gene expression) (Velculescu et al. (1995) *Science* 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)、代表差違分析(representation difference analysis; RDA) (Lisitsyn (1995) *Trends Genet.* 11: 303-7) 等により行うことができる。

細胞 *in situ* ハイブリダイゼーションでは、特定の RNA 配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総 RNA または polyA⁺RNA に対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞における RNA のプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNA の大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH) 及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA 転写産物を *in situ* で視覚的に捉えることも可能であり (Femino et al. (1998) *Science* 280: 585-90)、本発明において利用することができる。

遺伝子発現の解析で逆転写 PCR を用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1 つの RNA 転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写 PCR においてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写 PCR を行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じる mRNA アイソフォームを同定することができる。例えば、Pykett et al. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3: 559-64 等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明の PCR を利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものであ

る。

DNA チップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNA チップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたは DNA クローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対する cDNA クローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン特異的ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞より RNA を調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNA を得る。次に、得られた cDNA 試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識 cDNA 中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識 cDNA とチップ上の cDNA クローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を意味する蛍光シグナルの強度は、標識 cDNA 内での各配列の発現の度合いを示すことなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。

また、縮重 PCR プライマーを用いた逆転写 PCR を行う mRNA ディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定の mRNA の polyA 尾部に 3' 末端の 1 または 2 つの塩基を変更した修飾オリゴ dT プライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から単離した総 RNA に対して逆転写酵素反応を行う (Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3 269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA 尾部の直前に C を持つ mRNA を選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TG を直前に持つ mRNA を増幅することができる。次に、第 2 のプライマーとして、10 塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴ dT プライマー及び第 2 のプライマーを使

用して PCR 増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現している mRNA 由来の cDNA は、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法で 5 は、同定されていない遺伝子の発現についても解析することができる。

SAGE 分析は、多数の転写産物の発現を同時に検出することができ、また検出に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞より polyA⁺RNA を慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴ dT プラ 10 イマーを用い、前記 RNA を cDNA に変換し、4 塩基認識制限酵素(アンカー用酵素； AE)で処理する。ここで、AE 処理断片は、その 3' 末端にビオチン基を含んだ形となる。次に、AE 処理断片をストレプトアビシンに結合させ、結合された cDNA を 2 画分に分け、それぞれの画分を別々の 2 本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リン 15 カー)A 及び B に連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる 突出部の配列と相補的な配列を有する 1 本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enz yme; TE)となる IIS 型制限酵素(認識部位より 20bp 以下の離れた定位置の切断を行 う)の 5' 塩基認識配列、及び(3)PCR 用特異的プライマーを構成するのに十分な追 加配列より構成される。ここで、リンカーを連結した cDNA をタグ用酵素で切断す ることにより、リンカー結合型の状態で cDNA 配列部分のみが短鎖配列タグとなる。 20 次に、リンカーの異なる 2 種類のプールを互いに連結し、リンカー A 及び B に特 異的プライマーを使用して PCR 増幅する。その結果、増幅産物はリンカー A 及び B に結合した 2 つの隣接配列タグ(ダイタグ; ditag)を含む多様な配列の混在物とし て得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵素により処理し、遊離したダイタ 25 グ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニング により得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイ タグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定

- 4 0 -

し、配列タグの情報が得られれば、それぞれのタグに該当する mRNA の存在を同定することができる。

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差違のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン

5 産生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。

まず、本発明の前記細胞のうちの試験する細胞の DNA 試料を調製する(以下、テスト DNA と呼ぶ)。次に、比較する細胞の DNA(以下、ドライバーDNA と呼ぶ)を調製する。テスト DNA とドライバーDNA とを逆に用いることもできる。いずれにせよ、

10 テスト DNA に存在し、ドライバーDNA に存在しない遺伝子の存在が検出される。

次に、調製したテスト DNA 及び大過剰量のドライバーDNA を混合し、変性させ一本鎖 DNA とした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバーDNA 中には存在しない特異的な配列をテスト DNA 由来の DNA のみからなる二本鎖 DNA として単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954 及び Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9 等を参照することができる。

15

waroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954 及び Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9 等を参照することができる。

RDA 法は、PCR を利用した、ドライバーDNA に存在しないテスト DNA 中の配列を

選択的に增幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本

発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995)

20 Trends Genet. 11: 303-7 及び Schutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 92: 5950-4 を参照することができる。

以上のようにして検出、単離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うことができる。

- 41 -

本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。

ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壤、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

<65B13 の発現領域解析>

本発明により 65B13 遺伝子の発現制御領域が提供される。本発明の発現制御領域は、本発明のポリヌクレオチドを利用してゲノム DNA から公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1 マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊 8 新細胞工学実験プロトコール、東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社 (1993) pp. 362-374)が公知であり、本発明において利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の 5' 末端の 15~100bp、好ましくは 30~50bp をプローブ DNA として利用して、ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列

- 42 -

番号:1 の 1~176 番目または配列番号:2 の 1~126 番目の塩基全部またはその 1
部)。このようにして得られるクローンは、10 kbp 以上の 5' 非翻訳領域を含むも
のであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。
最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利
5 用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、本発明の 65B13 の発現
制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network 等のプログラム (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996)) を用いて予測することもできる。さらに、発現
10 制御領域の活性最小単位を予測するプログラム (<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestridge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32) も公知であり、本発明において用いることができる。

このようにして単離された、65B13 遺伝子の発現領域は、*in vivo* で分裂停止直
15 後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利
用することもできる。

<リガンドの同定>

本発明により、本発明のポリペプチドに対するリガンドが提供された。本発明
20 のポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋
め込まれた状態で存在すると考えられる。分裂停止直後のドーパミン産生ニュー
ロン前駆細胞で一過性に発現されていることから、ニューロンの成熟に関与して
いることが考えられる。従って、本発明のポリペプチドに対するアゴニストやア
ンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロ
25 ンの *in vivo*、*ex vivo* 及び *in vitro* における分化を制御するのに利用できる可
能性がある。本発明のポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、

- 43 -

本発明のポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、本発明のポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋めこまれた状態に発現させて用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

10 図面の簡単な説明

図1は、65B13-aのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。

図2は、65B13-aのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。図1の続きを示している。

15 図3は、65B13-bのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。

図4は、65B13-bのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。図3の続きを示している。

図5は、65B13-a及び65B13-bのアミノ酸配列の比較した図である。

20 図6は、65B13の構造の模式図である。黒く塗りつぶされた部分は膜貫通領域を、またIgは、Igドメインを示す。

図7は、E12.5マウス脳における65B13mRNAの発現を *in situ*ハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:矢状断面、B:傍矢状断面。HB:後脳、MB:中脳、SC:脊髄、CB:小脳原基。

25 図8は、E12.5マウス脊髄における65B13mRNAの発現を *in situ*ハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:65B13、B:NCAM、C:65B13、K

- 44 -

167、及びNCAMの発現領域の比較(各々、A及びBの枠内部分を拡大して示す)。

図9は、E12.5マウス中脳腹側における65B13mRNA、及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)mRNAの発現を *in situ*ハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:65B13、B:TH。

5 図10は、65B13の中脳における発現パターンを示す模式図である。

図11は、65B13の発現時期を示す模式図である。

図12は、抗65B13抗体を用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

図13は、65B13(Cy3)、Nurr1(FITC)、TH(Cy5)タンパク質の発現を、それ10それに対する抗体を用いて免疫蛍光染色法にて解析した結果を示す写真である。

図14は、65B13モノクローナル抗体を用いて、マウス12.5日胚中脳腹側(A)、または *in vitro*でES細胞からドーパミン産生ニューロンを分化誘導した細胞群(B)を染色し、フローサイトメトリーを用いて65B13発現細胞を検出した結果を示す図である。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明についてより詳細に検討するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

20

[実施例1]ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側と背側のRNAを用いてサブトラクション(N-RDA)法により発現の差のある遺伝子を増幅し、得られた遺伝子の配列を解析した。

25

1. N-RDA法

- 45 -

1-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μ M に調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

5 ad2S: cagctccacaaccta~~c~~atcatccgt (配列番号:11)

ad2A: acggaatgtatgt (配列番号:12)

ad3S: gtccatcttctcttgagactctgg (配列番号:13)

ad3A: accagagtctca (配列番号:14)

ad4S: ctgatgggtgtctctgtgagtg (配列番号:15)

10 ad4A: acacactcacag (配列番号:16)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgacagt (配列番号:17)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:18)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcg (配列番号:19)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:20)

15

1-2. cDNA 合成

マウス 12.5 日胚(日本 SLC) 中脳腹側及び背側領域より RNeasy mini kit (Qiagen) を用い全 RNA を調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA) を用いて二本鎖 cDNA を合成した。制限酵素 RsaI で消化したのち、ad2 を付加し、ad2S をプライマーとして 72°C で 5 分インキュベートした後、94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、及び 72°C で 2 分の反応を 15 サイクルの PCR を行い、最後に 72°C で 2 分インキュベートし、cDNA を増幅した。N-RDA の PCR はすべて以下の反応液組成で行った。

10 \times ExTaq 5 μ l

2.5 mM dNTP 4 μ l

25 ExTaq 0.25 μ l

100 μ M primer 0.5 μ l

- 46 -

cDNA 2 μ l

蒸留水 38.25 μ l

1-3. Driver の作製

5 ad2S で増幅した cDNA をさらに、94°Cで 2 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 5 サイクルの PCR を行い、最後に 7 2°Cで 2 分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて cDNA を精製し、RsaI 消化した。1 回のサブトラクションに 3 μ g ずつ使用した。

10 1-4. Tester の作製

ad2S で増幅した cDNA をさらに 94°Cで 2 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 5 サイクルの PCR を行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて cDNA を精製し、RsaI 消化した。60ng の RsaI 消化 cDNA に ad3 を付加した。

15

1-5. サブトラクション 1 回目

上記 3 及び 4 で作製した Tester および Driver を混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 μ l に溶解した。98°C 5 分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 μ l を加えた。さらに 98°C 5 分の後、68°Cで 16 時間ハイブリダイズさせた。

20 ハイブリダイズさせた cDNA を ad3S をプライマーとして 72°Cで 5 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 10 サイクル行った。続いて、Mung Bean Nuclease (TAKARA) で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。さらに 94°Cで 2 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 13 サイクルの PCR を行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートした。

- 47 -

1-6. 均一化

サブトラクション 1 回目で増幅した cDNA 8ng に 2xPCR buffer 1 μ l を加えた。98°C 5 分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ l を加えた。さらに 98°C 5 分の後、68°C で 16 時間ハイブリダイズさせた。

5 ハイブリダイズさせた cDNA を RsaI で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。これを ad3S をプライマーとして 94°C で 2 分インキュベートした後、94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、及び 72°C で 2 分の反応を 11 サイクルの PCR を行い、最後に 72°C で 2 分インキュベートした。RsaI で消化し、ad4 を付加した。

10 1-7. サブトラクション 2 回目

上記 6 で ad4 を付加した cDNA 20ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad5 を付加した。

15 1-8. サブトラクション 3 回目

上記 7 で ad5 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad13 を付加した。

20 1-9. サブトラクション 4 回目

上記 8 で ad13 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、以下、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅した cDNA を pCRII (Invitrogen) にクローニングし、ABI3100 シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

25 次に、N-RDA 法により得られた 65B13 断片の配列を用い、以下の方法で RACE を行った。

2. RACE 法

マウス 12.5 日胚脳より RNeasy mini kit (Qiagen) により全 RNA を調製し、 μ M ACS mRNA isolation kit (Miltenyi Biotec) を用いて mRNA を調製した。調製した mRNA より、Superscript choice system (Invitrogen) および pCRII ベクター (Invitrogen) を用いて cDNA ライブラリーを調製した。これよりプラスミド DNA を調製し、以下のプライマーを用いて PCR を行った。

TAU2: GGCTTTACACTTATGCTTCCGGCTC (配列番号:21)

TAU4: CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC (配列番号:22)

10 TAD3: AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG (配列番号:23)

TAD4: CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG (配列番号:24)

65B13 F1: CTTCCCGTATGCTACCTTGTCTCCAC (配列番号:25)

65B13 F2: TCCATCTCTCCAAGTGAAGGGTCTTG (配列番号:26)

65B13 R1: CCAACAGTCCTGCATGCTTGTAAATGA (配列番号:27)

15 65B13 R2: TCCTTCAATGTTCAGTTGGAGGGG (配列番号:28)

PCR の条件は次の通りであった。

1st PCR

10×ExTaq 2 μ l

2.5 mM dNTP 1.6 μ l

20 ExTaq 0.1 μ l

100 μ M TAU2 または TAD3 0.04 μ l

100 μ M 65B13 F1 または R1 0.2 μ l

cDNA (10ng/ μ l) 1 μ l

蒸留水 15.06 μ l

25 94°Cで 5 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 5 分の反応を 25 サイクル行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートした。続いて、1

- 49 -

回目のPCRにより得られた産物を100倍希釈して2nd PCRを行った。2nd PCRの条件は次の通りであった。

2nd PCR

10×ExTaq 5 μ l

5 2.5 mM dNTP 4 μ l

ExTaq 0.25 μ l

100 μ M TAU4 または TAD4 0.1 μ l

100 μ M 65B13 F2 または R2 0.5 μ l

1/100 1st PCR 産物 1 μ l

10 蒸留水 15.06 μ l

94°Cで5分インキュベートした後、94°Cで30秒、65°Cで30秒、及び72°Cで5分の反応を25サイクル行い、最後に72°Cで2分インキュベートした。増幅されたcDNA断片をpCRIIにクローニングし、ABI3100シーケンスアライザーを用いてシーケンスの解析を行った。

15 得られた2つの遺伝子、65B13-a及び65B13-bのスクレオチド配列を配列番号:1(図1及び2)、及び配列番号:2(図3及び4)として示す。65B13-aのコード領域は、配列番号:1の177番目のAから始まり、2278~2280番目の終止コドンまで続き、700アミノ酸からなる蛋白質をコードする。そして、そのうち177番目から228番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基はシグナル配列、1717番目から1767番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基は膜貫通領域であった。それに対し、65B13-bのコード領域は、配列番号:2の127番目のAから始まり、2277~2079番目の終止コドンまで続き、650アミノ酸からなる蛋白質をコードする。そして、そのうち127番目から177番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基はシグナル配列、1516番目から1566番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基は膜貫通領域であった。65B13-a及び65B13-b遺伝子にコードされるアミノ酸配列を配列番号:3及び4として示す。図5において示すように、両遺

- 5 0 -

伝子によりコードされるアミノ酸配列を比較したところ、65B13-a と 65B13-b とはアルタナティブスプライシングによるアイソフォームであり、65B13-b は 65B13-a に対し N 末端側の 50 アミノ酸が欠失することが判明した。65B13 遺伝子によりコードされる蛋白質はホモロジーサーチにより、図 6 に示すような 5 つの Ig ドメインを持つ、一回膜貫通型蛋白質であると考えられた。

[実施例 2] 65B13 遺伝子の発現解析

次に、これらの遺伝子を用いて以下のプロトコールにより *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

まず、マウス 12.5 日胚を OCT で包埋し、厚さ 16 μ m の新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に 4% PFA で室温 30 分間固定した。PBS で洗浄した後、ハイブリダイゼーション (1 μ g/ml DIG 化 RNA プローブ、50% ホルムアミド、5xSSC, 1% SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin) を 65 度で 40 時間行った。その後、洗浄 (50% ホルムアミド、5xSSC, 1% SDS) を 65 度で行い、RNase 処理 (5 μ g/ml RNase) を室温 5 分間行った。0.2xSSC で 65 度の洗浄、1xTBST で室温で洗浄の後、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリ フォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBST, 2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

そして、これらの遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期である E12.5 で、65B13 が中脳腹側、小脳原基、後脳、及び脊髄で発現していることが判った (図 7)。脊髄における発現をさらに増殖マーカーである Ki67 及び成熟マーカーである NCAM と比較したところ、Ki67 陽性の神経前駆細胞 (neural progenitor) の増殖する領域である脳室領域 (ventricular zone; VZ) 内の一部の細胞に 65B13 が発現しているのに対し、分裂停止後より成熟した NCAM 陽性の前駆細胞の存在する外套層 (mantle layer; ML) 内には発現が認められなかった (図 8)。脊髄以外の領域でも同様

に、VZ 内の一部の細胞で発現が認められた。これらの発現パターンから、65B13 は分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現するものと考えられた。

中脳では、最も腹側にあたる領域の VZ 内のみで発現が認められた。ドーパミン産生ニューロンのマーカー遺伝子であるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)の発現と比較すると、TH は ML にのみ発現しているため同一の細胞で両者の発現が認められることはものの、背-腹軸方向で発現領域が完全に一致していることが判明した(図 9)。一般に神経管内の神経細胞は、まず VZ 内で増殖し、分化開始と共に分裂を停止し、その後、すぐ外側の ML に移動してから成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロンの前駆体は、TH 発現領域のすぐ内側の VZ 内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してから TH を発現するものと考えられている。この前駆体の増殖する VZ 領域が 65B13 の発現領域と一致することから、65B13 は、中脳では分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現すると考えられた(図 10 及び 11)。

15 [実施例 3] 65B13タンパク質の発現解析

次に、65B13遺伝子のうち、細胞外領域をコードする遺伝子配列を用いて、以下のプロトコールにより抗65B13抗体を作製し、免疫組織染色による発現解析を行った。

まず、65B13遺伝子のうち、細胞外領域をコードする遺伝子配列を293E細胞に遺伝子導入して、65B13タンパク質の細胞外領域を発現させて回収した。回収したタンパク質をハムスターに免疫したのち、リンパ球細胞を取り出してミエローマ細胞とフュージョンさせた。フュージョンさせた細胞をマウスの腹腔内に移植し、腹水を得て、抗65B13モノクローナル抗体を精製した。次にマウス12.5日胚を4%PFA/PBS(−)で4℃、2時間固定したのち、20%ショ糖/PBS(−)で4℃、一晩置換し、OCT で包埋した。厚さ12μmの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で30分乾燥させ、PBS(−)で再び湿潤させた。その後、ブロッキング(ブロックエー

- 52 -

ス) を室温、20分間行い、作製した抗65B13モノクローナル抗体 (10ug/ml、2.5% ブロックエース/PBS) 、抗TH抗体 (Chemicon、0.7ug/ml、2.5%ブロックエース/PBS) 、抗Nurr1抗体 (Santa Cruz、4ug/ml、2.5%ブロックエース/PBS) を室温、1時間反応させた後、さらに4°C、一晩反応させた。0.1%Triton X-100/PBS (-) で、室温、10分間の洗浄を4回行った。Cy3標識抗ハムスターIgG抗体、FITC標識抗ウサギ IgG抗体、Cy5標識抗マウスIgG抗体 (Jackson、10ug/ml、2.5%ブロックエース) を室温、1時間反応させ、同様に洗浄を行った後、PBS (-) によって室温、10分間洗浄し、包埋した。

そして、作製した抗65B13モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色による発現解析の結果、*in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果と同様に、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、中脳腹側に発現が認められた (図13)。ドーパミン産生ニューロンのマーカーであるTH、Nurr1タンパク質の発現と比較すると、65B13タンパク質はTH、Nurr1タンパク質が発現する中脳最腹側のVZ側に発現していることから、65B13タンパク質はドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられた。

[実施例4] フローサイトメトリーによる65B13発現細胞の検出

次に、抗65B13モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによる65B13発現細胞の検出を行った。

まず、マウス12.5日胚より中脳腹側部分を切り出したもの、または、*in vitro*においてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、細胞分散バッファー (Invitrogen) を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、抗65B13モノクローナル抗体 (10ug/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/PBS) で4°C、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/PBS (-) で4°C、3分間の洗浄を3回行い、PE標識抗ハムスターIgG抗体 (Pharmingen、4ug/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/PBS) で4°C、20分間染色し、同様に洗浄して、フローサイ

トメーターにて65B13発現細胞を検出した。

そして、作製した抗65B13モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる65B13発現細胞の検出の結果、65B13タンパク質を発現する集団を検出した（図14）。固定・透過処理することなく、65B13発現細胞を検出できることから、

5 セルソーターを付属したフローサイトメーターを用いることにより、65B13発現細胞を生細胞の状態で分離することが可能であると考えられた。65B13タンパク質はドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられることから、65B13はドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離に有用であると考えられた。

10 産業上の利用の可能性

本発明により、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する新規遺伝子65B13が得られた。細胞における該65B13の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。また、分裂停止直後のニューロン前駆細胞を選択的に得られるため、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、*in vitro*で最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の遺伝子を用いて得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能となった。該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節（阻害または促進）するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

請求の範囲

1. 分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B1
3 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする以下の(1)～(4)のヌク
5 レオチド配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。
 - (1)配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2 の 127 番目
から 2079 番目の塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (2)配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、また
は該核酸配列に相補的な配列
 - (3)配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列においてシグナル配列部分を
欠く配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (4)配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のア
ミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする
核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
- 10 (5)上記(1)の配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする
核酸配列
2. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
3. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 2 記載のベクターを含む宿主
細胞。
- 20 4. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。
5. 請求項 4 記載のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を有
するポリペプチド断片。
6. 請求項 4 記載のポリペプチド、または請求項 5 記載のポリペプチド断片に対
する抗体。
- 25 7. 請求項 5 記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖。
8. ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、請求項 6 記載の抗体とド

- 55 -

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接觸させる工程を含む方法。

9. ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、請求項4記載のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接觸させる工程を含む方法。

10. 請求項8または9記載の方法により選択された分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞。

11. ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項10記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。

12. 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、請求項10記載の前駆細胞に對し、被験物質を接觸させる工程、及び接觸による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

5

10

15

図 1

GAT	GAG	CCA	GAT	TTC	GGG	GAC	TCT	GGG	CCA	GAC	ATA	AAA	TCT	TCC	AGC	CCG	GAG	54	
AGA	ATT	GTG	TGC	AGA	GAG	GGG	CTC	CAG	TCC	AGC	GTG	GTG	TGA	GAG	GCG	TGC	TAT	108	
CAA	GAA	AGA	AGT	TGG	AGG	GGG	ACC	AGT	GCA	ACC	CTA	ACT	CTA	CGA	GAT	CTT	GGG	162	
GTA	CAC	ACA	CTC	GGG	ATG	CTG	GCC	TCC	GCC	CTC	CTC	GTT	TTC	CTT	TGC	TGT	TTC	216	
							M	L	A	S	A	L	L	V	F	L	C	C	F
AAA	GGA	CAT	GCA	GGC	TCA	TCG	CCC	CAT	TTC	CTA	CAA	CAG	CCA	GAG	GAC	ATG	GTG	270	
K	G	H	A	G	S	S	P	H	F	L	Q	Q	P	E	D	M	V		
GTG	CTG	TTG	GGG	GAG	GAA	GCC	CGG	CTG	CCC	TGC	GCT	CTG	GGC	GCG	TAC	AGG	GGG	324	
V	L	L	G	E	E	A	R	L	P	C	A	L	G	A	Y	R	G		
CTC	GTG	CAG	TGG	ACT	AAG	GAT	GGG	CTG	GCT	CTA	GGG	GGC	GAA	AGA	GAC	CTT	CCA	378	
L	V	Q	W	T	K	D	G	L	A	L	G	G	E	R	D	L	P		
GGG	TGG	TCC	CGG	TAC	TGG	ATA	TCG	GGG	AAT	TCA	GCC	AGT	GGC	CAG	CAT	GAC	CTC	432	
G	W	S	R	Y	W	I	S	G	N	S	A	S	G	Q	H	D	L		
CAC	ATT	AAG	CCT	GTG	GAA	TTG	GAA	GAT	GAG	GCA	TCG	TAT	GAG	TGC	CAG	GCT	TCG	486	
H	I	K	P	V	E	L	E	D	E	A	S	Y	E	C	Q	A	S		
CAA	GCA	GGT	CTC	CGA	TCA	CGA	CCA	GCC	CAA	CTG	CAC	GTG	ATG	GTC	CCC	CCA	GAA	540	
Q	A	G	L	R	S	R	P	A	Q	L	H	V	M	V	P	P	E		
GCT	CCC	CAG	GTA	CTA	GGC	GGC	CCC	TCT	GTG	TCT	CTG	GTT	GCT	GGG	GTT	CCT	GGA	594	
A	P	Q	V	L	G	G	P	S	V	S	L	V	A	G	V	P	G		
AAT	CTG	ACC	TGT	CGG	AGT	CGT	GGG	GAT	TCC	CGA	CCT	GCC	CCT	GAA	CTA	CTG	TGG	648	
N	L	T	C	R	S	R	G	D	S	R	P	A	P	E	L	L	W		
TTC	CGA	GAT	GGG	ATC	CGG	CTG	GAT	GCG	AGC	AGC	TTC	CAC	CAG	ACC	ACG	CTG	AAG	702	
F	R	D	G	I	R	L	D	A	S	S	F	H	Q	T	T	L	K		
GAC	AAG	GCC	ACT	GGA	ACA	GTG	GAA	AAC	ACC	TTA	TTC	CTG	ACC	CCT	TCC	AGT	CAT	756	
D	K	A	T	G	T	V	E	N	T	L	F	L	T	P	S	S	H		
GAT	GAT	GGC	GCC	ACC	TTG	ATC	TGC	AGA	GCG	CGA	AGC	CAG	GCC	CTG	CCC	ACA	GGG	810	
D	D	G	A	T	L	I	C	R	A	R	S	Q	A	L	P	T	G		
AGG	GAC	ACA	GCT	GTT	ACA	CTG	AGC	CTT	CAG	TAT	CCC	CCA	ATG	GTG	ACT	CTG	TCT	864	
R	D	T	A	V	T	L	S	L	Q	Y	P	P	M	V	T	L	S		
GCT	GAG	CCC	CAG	ACT	GTG	CAG	GAG	GGA	GAG	AAG	GTG	ACT	TTC	CTG	TGT	CAA	GCC	918	
A	E	P	Q	T	V	Q	E	G	E	K	V	T	F	L	C	Q	A		
ACT	GCC	CAG	CCT	GTC	ACT	GGC	TAC	AGG	TGG	GCG	AAG	GGG	GGA	TCC	CCG	GTG	972		
T	A	Q	P	P	V	T	G	Y	R	W	A	K	G	G	S	P	V		
CTC	GGG	GCA	CGT	GGG	CCA	AGG	TTG	GAG	GTC	GTT	GCA	GAT	GCC	ACT	TTC	CTG	ACT	1026	
L	G	A	R	G	P	R	L	E	V	V	A	D	A	T	F	L	T		
GAG	CCG	GTC	TCC	TGC	GAG	GTC	AGC	AAC	GCG	GTC	GGA	AGC	GCC	AAC	CCG	AGC	ACG	1080	
E	P	V	S	C	E	V	S	N	A	V	G	S	A	N	R	S	T		
GCG	CTG	GAA	GTG	TTG	TAT	GGA	CCC	ATT	CTG	CAG	GCA	AAA	CCT	AAG	TCC	GTG	TCC	1134	
A	L	E	V	L	Y	G	P	I	L	Q	A	K	P	K	S	V	S		
GTG	GAC	GTG	GGG	AAA	GAT	GCC	TCC	TTC	AGC	TGT	GTC	TGG	CGC	GGG	AAC	CCA	CTT	1188	
V	D	V	G	K	D	A	S	F	S	C	V	W	R	G	N	P	L		
CCA	CGG	ATA	ACC	TGG	ACC	CGC	ATG	GGT	GGC	TCT	CAG	GTG	CTG	AGC	TCC	GGG	CCC	1242	
P	R	I	T	W	T	R	M	G	G	S	Q	V	L	S	S	G	P		
ACG	CTG	CGG	CTT	CCG	TCC	GTG	GCA	CTG	GAG	GAT	GCG	GGC	GAC	TAT	GTA	TGC	AGG	1296	
T	L	R	L	P	S	V	A	L	E	D	A	G	D	Y	V	C	R		
GCT	GAG	CCG	AGG	AGA	ACG	GGT	CTG	GGA	GGC	GGC	AAA	GCG	CAG	GCG	AGG	CTG	ACT	1350	
A	E	P	R	R	T	G	L	G	G	G	K	A	Q	A	R	L	T		
GTG	AAC	GCA	CCC	CCT	GTA	GTG	ACA	GCC	CTG	CAA	CCT	GCA	CCA	GCC	TTT	CTG	AGG	1404	
V	N	A	P	P	V	V	T	A	L	Q	P	A	P	A	F	L	R		

2 / 14

2

3 / 14

図3

GAG	AGA	ATT	GTG	TGC	AGA	GAG	AGG	CTC	CAG	TCC	AGC	GTG	GTG	TGA	GAG	GCG	TGC	54
TAT	CAA	GAA	AGA	AGT	TGG	AGG	GGA	ACC	AGT	GCA	ACC	CTA	ACT	CTA	CGA	GAT	CTT	108
GGG	GTA	CAC	ACA	CTC	GGG	ATG	CTG	GCC	TCC	GCC	CTC	CTC	GTT	TTC	CTT	TGC	TGT	162
										M	L	A	S	A	L	L	V	
															F	L	C	
TTC	AAA	GGA	CAT	GCA	GGG	TGG	TCC	CGG	TAC	TGG	ATA	TCG	GGG	AAT	TCA	GCC	AGT	216
F	K	G	H	A	G	W	S	R	Y	W	I	S	G	N	S	A	S	
GGC	CAG	CAT	GAC	CTC	CAC	ATT	AAG	CCT	GTG	GAA	TTG	GAA	GAT	GAG	GCA	TCG	TAT	270
G	Q	H	D	L	H	I	K	P	V	E	L	E	D	E	A	S	Y	
GAG	TGC	CAG	GCT	TCG	CAA	GCA	GGT	CTC	CGA	TCA	CGA	CCA	GCC	CAA	CTG	CAC	GTG	324
E	C	Q	A	S	Q	A	G	L	R	S	R	P	A	Q	L	H	V	
ATG	GTC	CCC	CCA	GAA	GCT	CCC	CAG	GTA	CTA	GGC	GGC	CCC	TCT	GTG	TCT	CTG	GTT	378
M	V	P	P	E	A	P	Q	V	L	G	G	P	S	V	S	L	V	
GCT	GGA	GTT	CCT	GGA	AAT	CTG	ACC	TGT	CGG	AGT	CGT	GGG	GAT	TCC	CGA	CCT	GCC	432
A	G	V	P	G	N	L	T	C	R	S	R	G	D	S	R	P	A	
CCT	GAA	CTA	CTG	TGG	TTC	CGA	GAT	GGG	ATC	CGG	CTG	GAT	GCG	AGC	AGC	TTC	CAC	486
P	E	L	L	W	F	R	D	G	I	R	L	D	A	S	S	F	H	
CAG	ACC	ACG	CTG	AAG	GAC	AAG	GCC	ACT	GGA	ACA	GTG	GAA	AAC	ACC	TTA	TTC	CTG	540
Q	T	T	L	K	D	K	A	T	G	T	V	E	N	T	L	F	L	
ACC	CCT	TCC	AGT	CAT	GAT	GAT	GGC	GCC	ACC	TTG	ATC	TGC	AGA	GCG	CGA	AGC	CAG	594
T	P	S	S	H	D	D	G	A	T	L	I	C	R	A	R	S	Q	
GCC	CTG	CCC	ACA	GGG	AGG	GAC	ACA	GCT	GTT	ACA	CTG	AGC	CTT	CAG	TAT	CCC	CCA	648
A	L	P	T	G	R	D	T	A	V	T	L	S	L	Q	Y	P	P	
ATG	GTG	ACT	CTG	TCT	GCT	GAG	CCC	CAG	ACT	GTG	CAG	GAG	GGA	GAG	AAG	GTG	ACT	702
M	V	T	L	S	A	E	P	Q	T	V	Q	E	G	E	K	V	T	
TTC	CTG	TGT	CAA	GCC	ACT	GCC	CAG	CCT	CCT	GTC	ACT	GGC	TAC	AGG	TGG	GCG	AAG	756
F	L	C	Q	A	T	A	Q	P	P	V	T	G	Y	R	W	A	K	
GGG	GGA	TCC	CCG	GTG	CTC	GGG	GCA	CGT	GGG	CCA	AGG	TTG	GAG	GTC	GTT	GCA	GAT	810
G	G	S	P	V	L	G	A	R	G	P	R	L	E	V	V	A	D	
GCC	ACT	TTC	CTG	ACT	GAG	CCG	GTG	TCC	TGC	GAG	GTC	AGC	AAC	GCG	GTC	GGA	AGC	864
A	T	F	L	T	E	P	V	S	C	E	V	S	N	A	V	G	S	
GCC	AAC	CGC	AGC	ACG	GCG	CTG	GAA	GTG	TTG	TAT	GGA	CCC	ATT	CTG	CAG	GCA	AAA	918
A	N	R	S	T	A	L	E	V	L	Y	G	P	I	L	Q	A	K	
CCT	AAG	TCC	GTG	TCC	GTG	GAC	GTG	GGG	AAA	GAT	GCC	TCC	TTC	AGC	TGT	GTC	TGG	972
P	K	S	V	S	V	D	V	G	K	D	A	S	F	S	C	V	W	
CGC	GGG	AAC	CCA	CTT	CCA	CGG	ATA	ACC	TGG	ACC	CGC	ATG	GGT	GGC	TCT	CAG	GTG	1026
R	G	N	P	L	P	R	I	T	W	T	R	M	G	G	S	Q	V	
CTG	AGC	TCC	GGG	CCC	ACG	CTG	CGG	CTT	CCG	TCC	GTG	GCA	CTG	GAG	GAT	GCG	GGC	1080
L	S	S	G	P	T	L	R	L	P	S	V	A	L	E	D	A	G	
GAC	TAT	GTA	TGC	AGG	GCT	GAG	CCG	AGG	AGA	ACG	GGT	CTG	GGA	GGC	GGC	AAA	GCG	1134
D	Y	V	C	R	A	E	P	R	R	T	G	L	G	G	G	K	A	
CAG	GCG	AGG	CTG	ACT	GTG	AAC	GCA	CCC	CCT	GTA	GTG	ACA	GCC	CTG	CAA	CCT	GCA	1188
Q	A	R	L	T	V	N	A	P	P	V	V	T	A	L	Q	P	A	

4 / 1 4

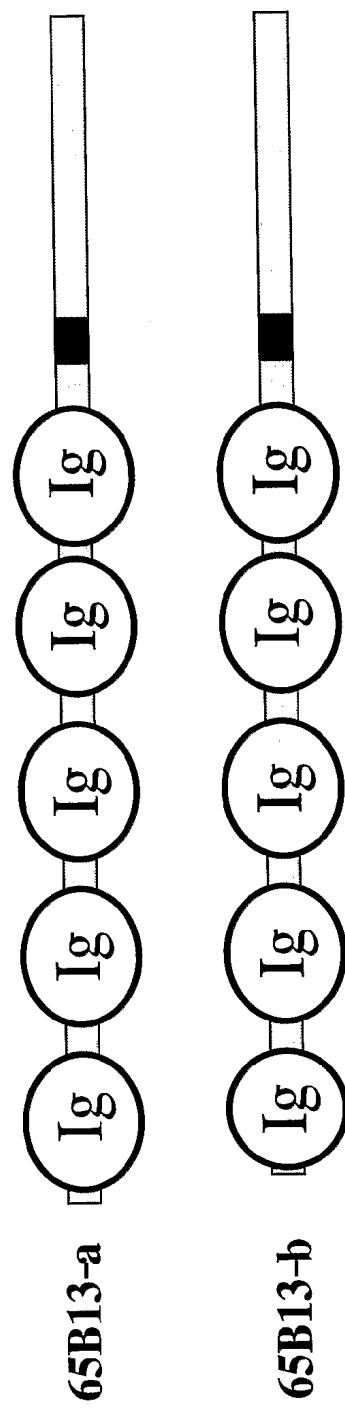
图 4

図 5

		10	20	30	40	50
65B13-a	1	MLASALLVFI	CCFKGHAGSS	PHFLQQPEDM	VVLLGEEARL	PCALGAYRGL
65B13-b	1	MLASALLVFI	CCFKGHAG	-----	-----	-----
		60	70	80	90	100
65B13-a	51	VQWTKDGLAL	GGERDLPGWS	RYWISGNSAS	GQHDLHIKPV	RLEDEASYEC
65B13-b	51	-----	WS	RYWISGNSAS	GQHDLHIKPV	ELEDEASYEC
		110	120	130	140	150
65B13-a	101	QASQAGLRSR	PAOLHVMVPP	EAPQVLGGPS	VSLVAGVPGN	LTCRSRGDSR
65B13-b	101	QASQAGLRSR	PAOLHVMVPP	EAPQVLGGPS	VSLVAGVPGN	LTCRSRGDSR
		160	170	180	190	200
65B13-a	151	PAPELLWFRD	GIRLDASSFH	QTTLKDKATG	TVENTLFLTP	SSHDDGATLJ
65B13-b	151	PAPELLWFRD	GIRLDASSFH	QTTLKDKATG	TVENTLFLTP	SSHDDGATLJ
		210	220	230	240	250
65B13-a	201	CRARSOALPT	GRDTAVTLSI	QYPPMVTLSA	EPQTIVQEGEK	VTFLCOATAQ
65B13-b	201	CRARSOALPT	GRDTAVTLSI	QYPPMVTLSA	EPQTIVQEGEK	VTFLCOATAQ
		260	270	280	290	300
65B13-a	251	PPVTGYRWAK	GGSPVLCARG	PRIEVVADAT	FLTEPVSC	SNAVGSA
65B13-b	251	PPVTGYRWAK	GGSPVLCARG	PRIEVVADAT	FLTEPVSC	SNAVGSA
		310	320	330	340	350
65B13-a	301	TALEVLYGPI	LQAKPKSVSV	DVGKDASFSC	VWRGNPLPRI	TWTRMGGSOV
65B13-b	301	TALEVLYGPI	LQAKPKSVSV	DVGKDASFSC	VWRGNPLPRI	TWTRMGGSOV
		360	370	380	390	400
65B13-a	351	LSSGPTLRLP	SVALEDAQDY	VCRAEPRRTG	IGGGKAOARI	TVNAPPVVTA
65B13-b	351	LSSGPTLRLP	SVALEDAQDY	VCRAEPRRTG	IGGGKAOARI	TVNAPPVVTA
		410	420	430	440	450
65B13-a	401	LQPAPAFLRG	PARLQCVVFA	SPAPDSVVWS	WDEGFLEAGS	LGRFLVEA
65B13-b	401	LQPAPAFLRG	PARLQCVVFA	SPAPDSVVWS	WDEGFLEAGS	LGRFLVEA
		460	470	480	490	500
65B13-a	451	APEVEGGQGP	CLISVLHISG	TQESDFTTGF	NCSARNRLGE	GRVQIHLGRR
65B13-b	451	APEVRGGQGP	CLISVLHISG	TQESDFTTGF	NCSARNRLGE	GRVQIHLGRR
		510	520	530	540	550
65B13-a	501	DLLPTVRIVA	GAASAATSLI	MVITGVVLCC	WRHGSLSKQK	NLVRIPGSSE
65B13-b	501	DLLPTVRIVA	GAASAATSLI	MVITGVVLCC	WRHGSLSKQK	NLVRIPGSSE
		560	570	580	590	600
65B13-a	551	GSSSRGPEEE	TGSSEDRGPJ	VHTDHSDLVL	EEKEAILETKD	PTNGYYKVRC
65B13-b	551	GSSSRGPEEE	TGSSEDRGPJ	VHTDHSDLVL	EEKEAILETKD	PTNGYYKVRC
		610	620	630	640	650
65B13-a	601	VSVSLSLGEA	PGGGI.FLPPP	SPIGLPGTPT	YYDFKPHLDL	VPPCRLYRAR
65B13-b	601	VSVSLSLGEA	PGGGI.FLPPP	SPIGLPGTPT	YYDFKPHLDL	VPPCRLYRAP
		660	670	680	690	700
65B13-a	651	AGYLTTPHPR	AFTSYMKP	FGPPDLSSG	PPFPYATLSP	PSHQRLOTHV
65B13-b	651	AGYLTTPHPR	AFTSYMKP	FGPPDLSSG	PPFPYATLSP	PSHQRLOTHV

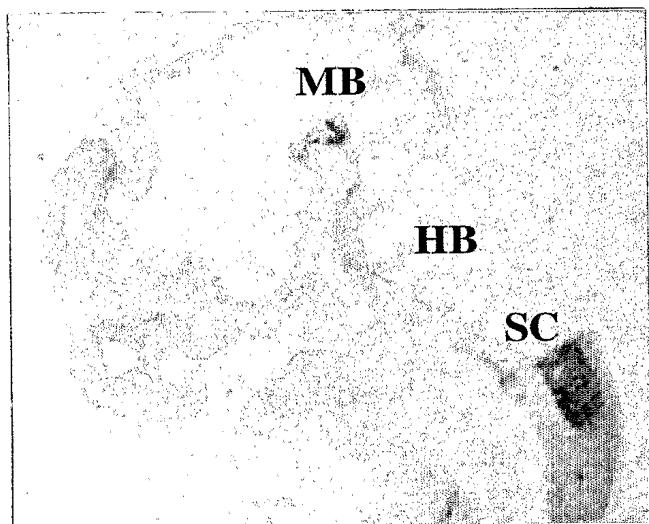
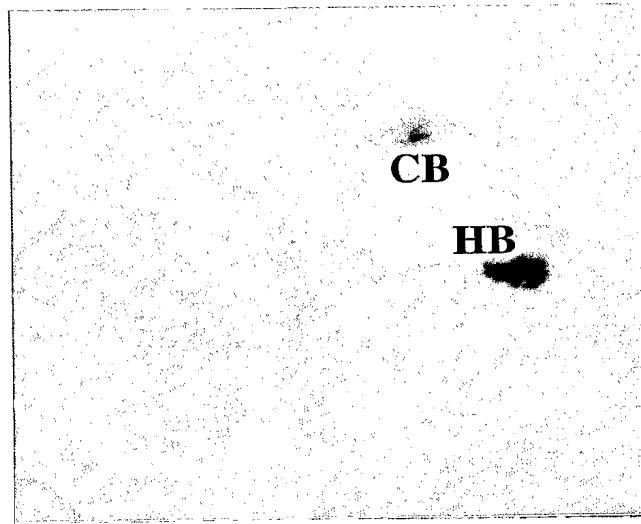
6 / 1 4

図 6



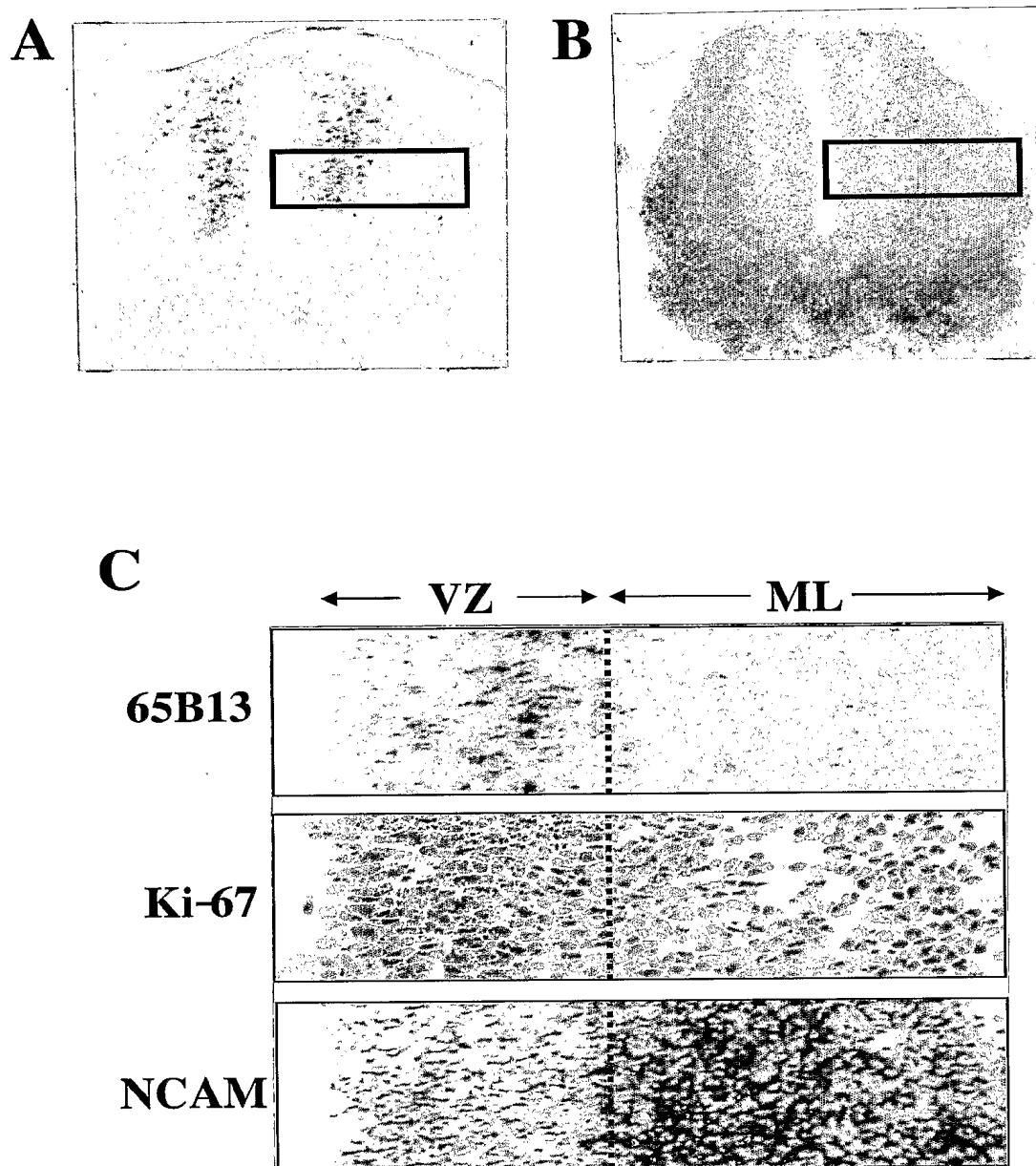
7 / 1 4

図 7

A**B**

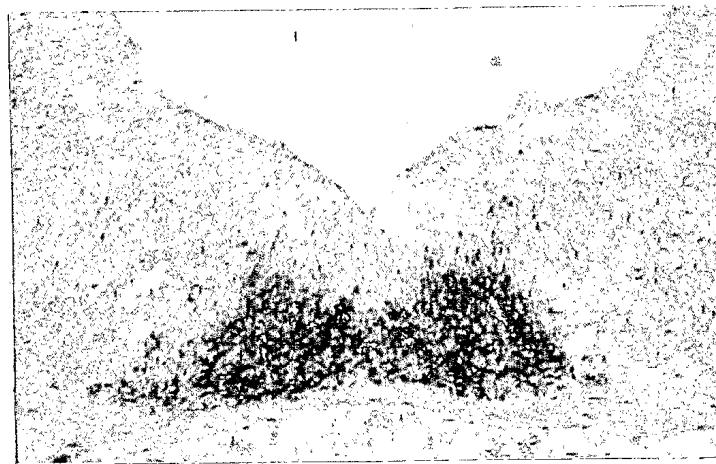
8 / 14

図 8



9 / 14

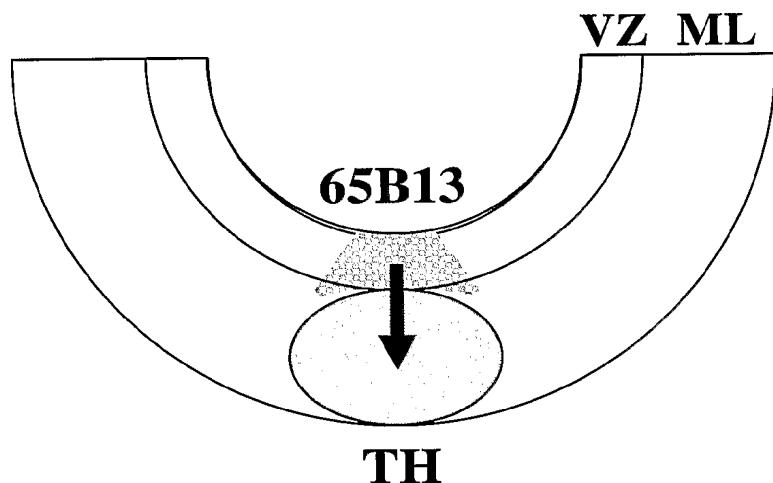
図 9

A**B**

10 / 14

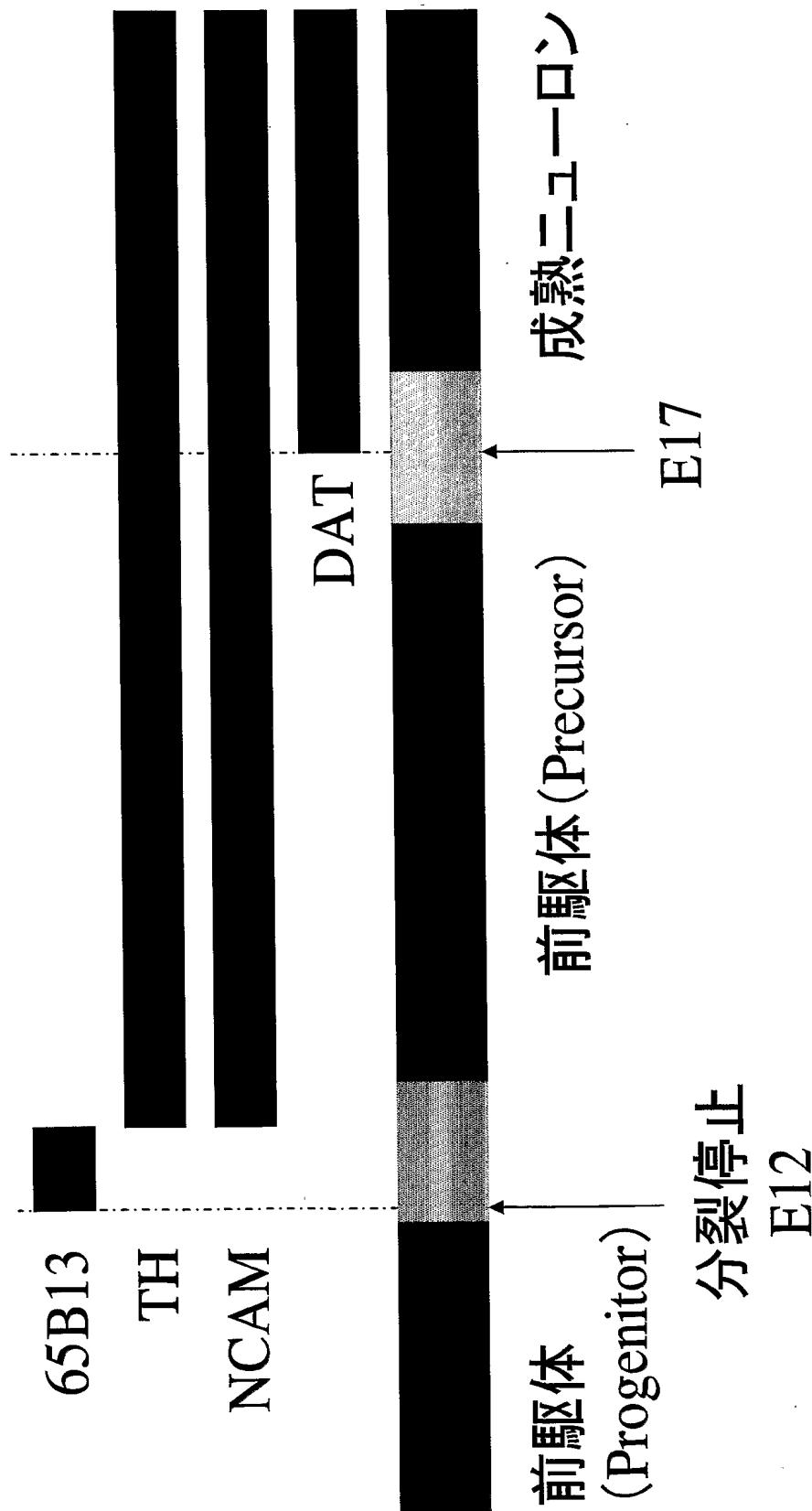
図 10

中脳腹側



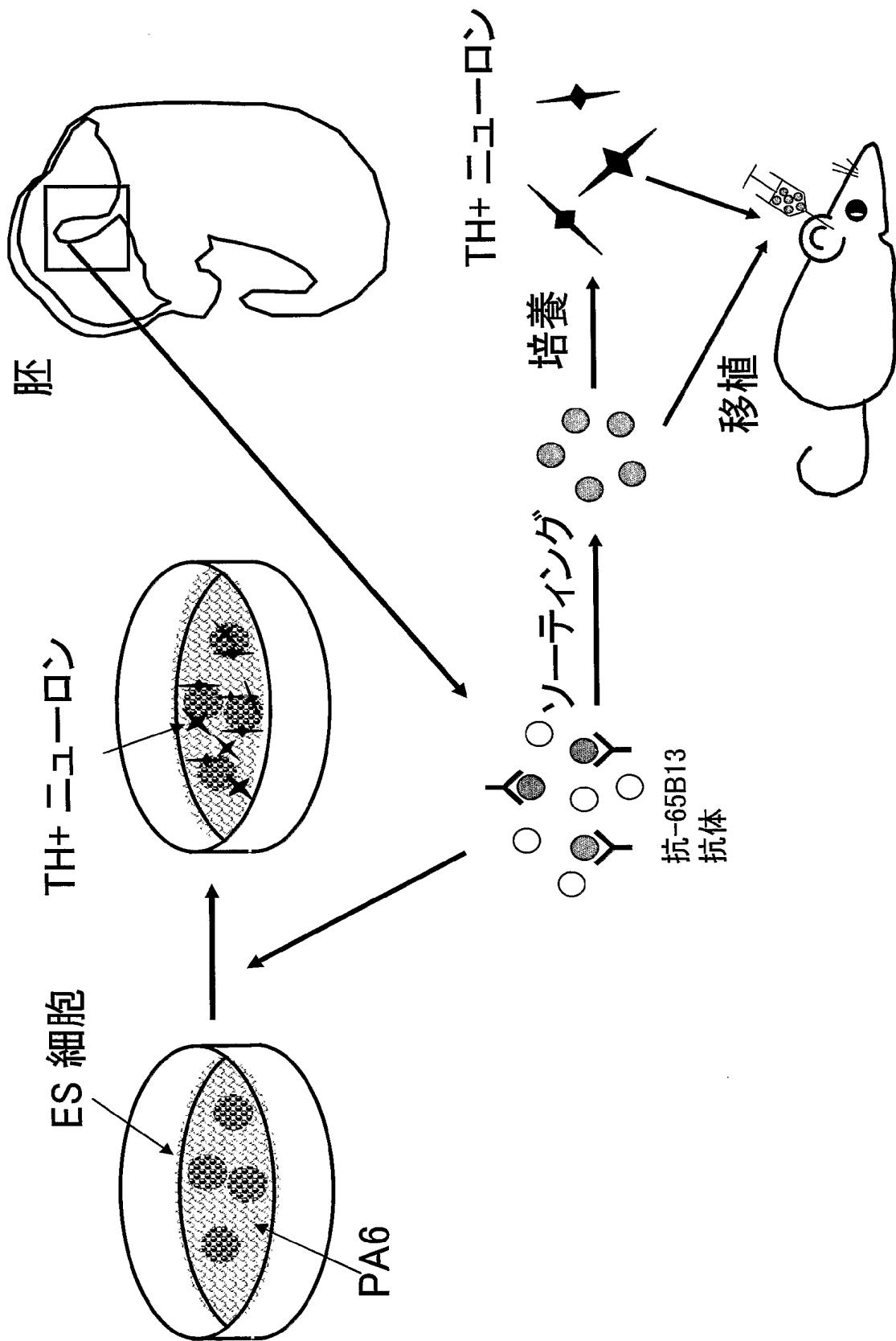
11 / 14

図 11



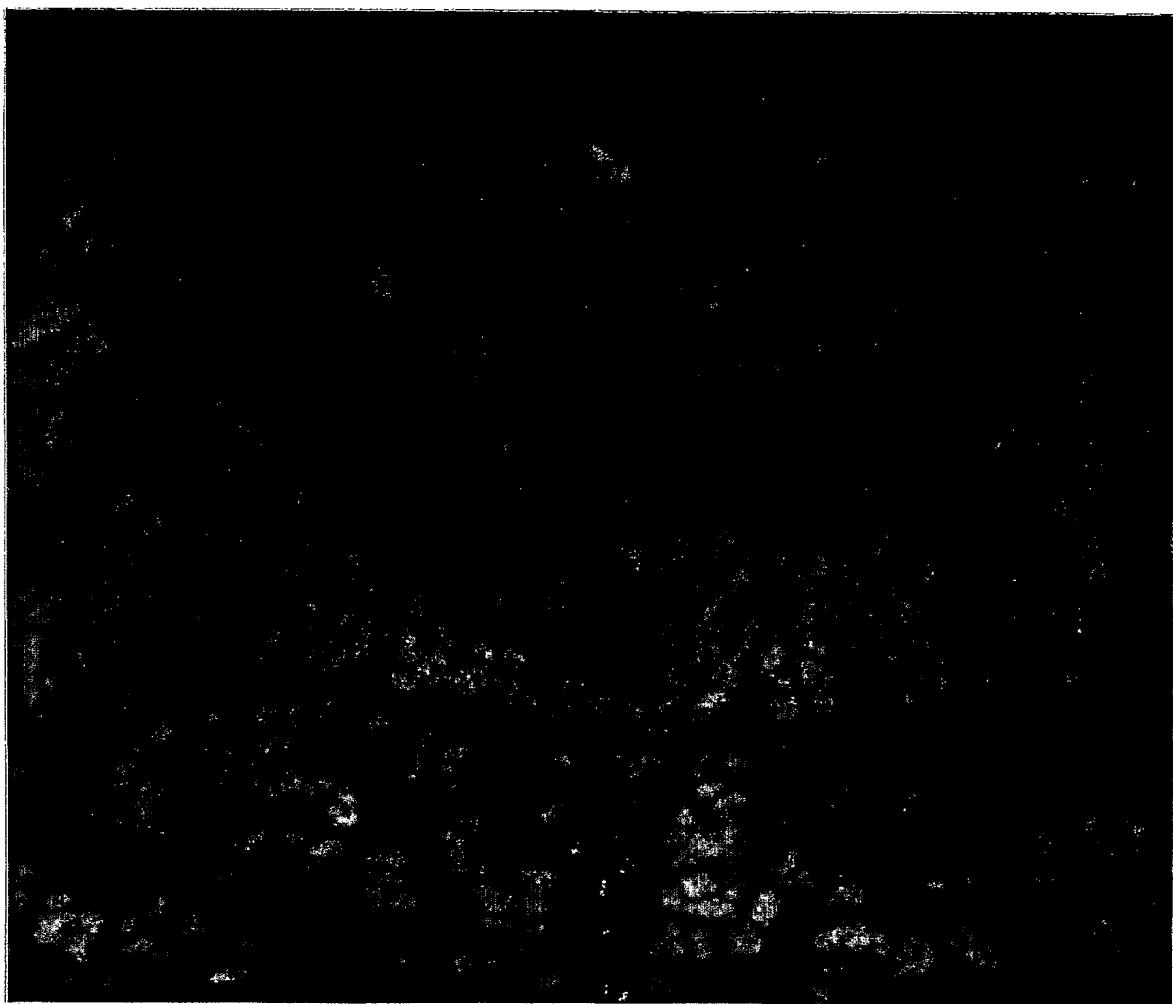
12 / 14

図 12



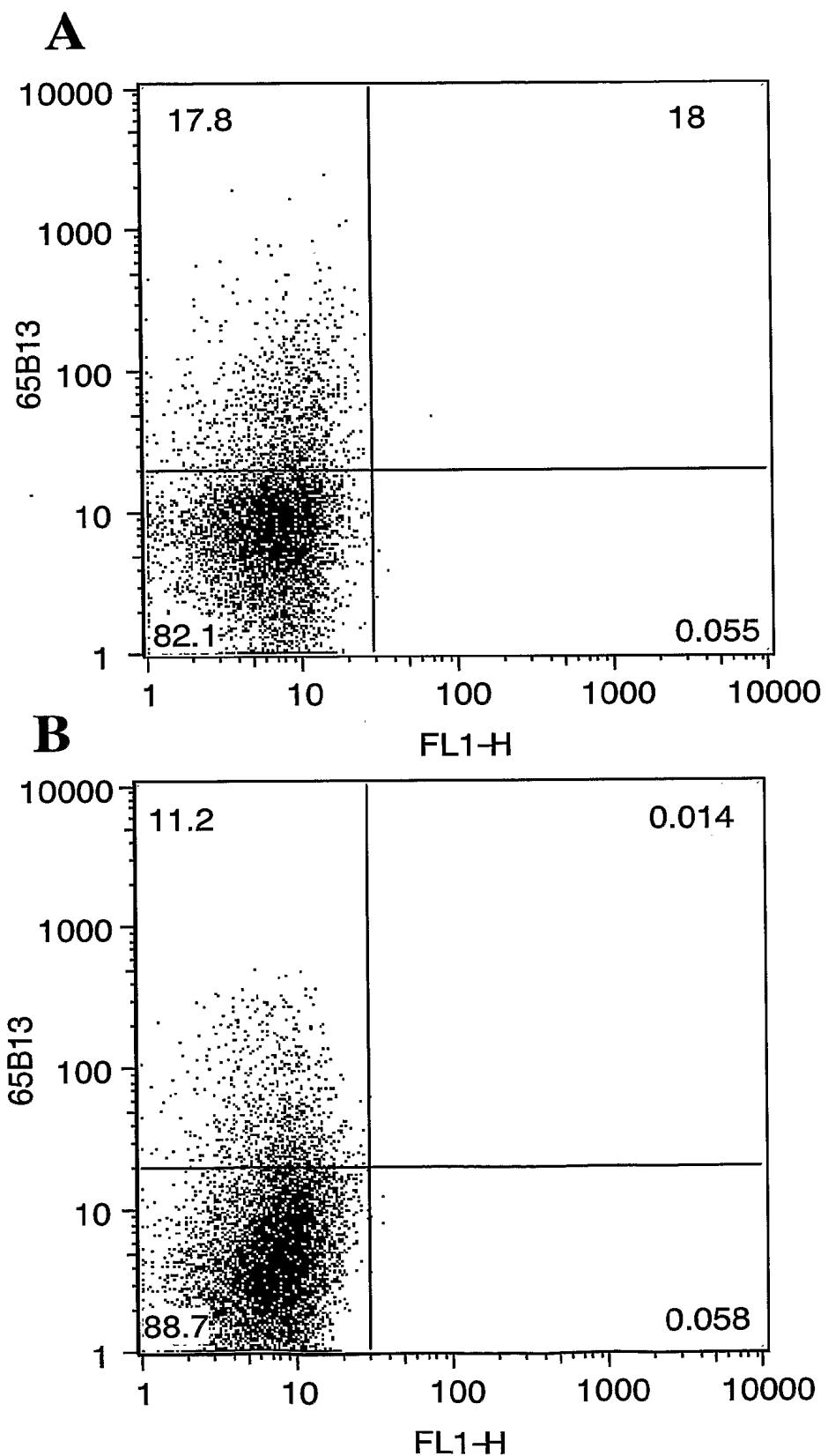
13/14

図13



14/14

図14



1 / 3 9

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Gene specifically expressed in postmitotic dopaminergic neuronal precursor

<130> E1-A0203P

<150> JP 2002-307573

<151> 2002-10-22

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2876

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1

gatgagccag atttcgggga ctctgggcca gacataaaat ctccagccc ggagagaatt 60
gtgtcagag aggggctcca gtccagcgtg gtgtgagagg cgtgcatac aaaaaaaagt 120
tggagggaa ccagtgcac cctaactcta cgagatcttgggtacacac actcggatg 180
ctggcctccg ccctcctcgt ttcccttgc tgtttcaaag gacatgcagg ctcatgcggcc 240

2 / 3 9

catttcctac aacagccaga ggacatggtg gtgctgttgg gggaggaagc ccggctgccc 300
tgcgcctctgg gcgcgtacag ggggcctcgta cagtggacta aggatggct ggctcttaggg 360
ggcgaaagag accttccagg gtggtcccgg tactggatat cgggaaattc agccagtgcc 420
cagcatgacc tccacattaa gcctgtggaa ttgaaagatg aggcatcgta tgagtgccag 480
gcttcgcaag caggctctcg atcacgacca gcccaactgc acgtgtatggt ccccccagaa 540
gctccccagg tactaggcgg cccctctgtg tctctgttggt ctggagttcc tgaaaatctg 600
acctgtcgga gtcgtgggaa ttccgcacct gcccctgaac tactgtggtt ccgagatggg 660
atccggctgg atgcgagcag cttccaccag accacgcgtg aggacaaggc cactggaaca 720
gtggaaaaca ctttattcct gacccttcc agtcatgatg atggcgccac cttgatctgc 780
agagcgcgaa gccaggccct gcccacaggg agggacacag ctgttacact gagccttcag 840
tatcccccaa tggtgactct gtctgtcgag cccagactg tgcaaggagg agagaaggta 900
actttctgt gtcaagccac tgcccgcct cctgtcactg gctacaggtg ggcgaagggg 960
ggatccccgg tgctcggggc acgigggcca aggttggagg tcgttgcaga tgccacttcc 1020
ctgactgagc cgggtgtcccg cgaggtcagc aacgcggtcg gaagcgccaa ccgcagcacg 1080
gcgcgtggaaag tggccactt cagctgtgtc tggcgccggaa acccacttcc acggataacc 1140
tggacccgca tgggtggcctc tcaggtgctg agctccgggc ccacgcgtcg gcttccgtcc 1200
gtggcactgg aggatgcggg cgactatgtt tgcagggctg agccgaggag aacgggtctg 1260
ggaggcggca aagcgcagggc gaggctgact gtgaacgcac cccctgttagt gacagccctg 1320
caacctgcac cagccttctt gagggtcct gctcgccctcc agtgtgtgtt gttgcctcc 1380
cctgccccag actcggtggt ttggcttgg gacgagggtt tcttggaggc aggctcactg 1440
ggcaggcttcc tagtggaaagc cttccagcc ccggaaagtgg aggggggaca gggccctggc 1500
cttatttctg tgctacacat ttccggaaacc caggagtccg acttaccac cggcttcaac 1560
tgcaatgcggcc gcaaccggct aggagaggga cgagttccaga tccacttggg ccgttagat 1620
ttgctgccta ctgtccggat tggctgtgtt gcagcatctg cagccacccctc tctccatgt 1680
gtcatcactg gagtggtcct ctgtgtgtt ccgttaggtt ctctctctaa gcaaaaagaaac 1740
1800

3 / 3 9

ttggtccgga tcccaggaag cagcgagggt tccagttcac gtggccctga ggaggagaca 1860
ggcagcagtg aggaccgggg tcccaattgtg cacaccgacc acagtgattt gtttctttag 1920
aaaaaaagagg ctctggagac aaaggatcca accaacggtt actacaagggt tcgaggggtc 1980
agtgtgagcc tttagccttgg ggaagctcct ggaggaggcc tcttcttgcc accgcccct 2040
ccgatcggtc tcccagggac tcctacttac tatgacttca agccacatct ggacttagtc 2100
cctccctgca gactgtacag agcgagggca gtttatctta ccacccccc tccccgtgcc 2160
ttcaccagct acatgaaacc cacatcctt ggaccccccag attttagctc tggaactccc 2220
ccctccctgt atgctaccctt gtctccaccc agccaccagc gtctccagac tcatgtgtga 2280
atccatctct ccaagtgaag ggtcttggaa tcttctgttt gccatatagt gtgttgtcca 2340
gattttctggg gagtcagaac aagttagtga ccaacccctc caaaactgaa cattgaagga 2400
gggaaagatc attacaagca tcaggactgt tggtagtacac tcagttcagc caaagtggat 2460
tctccaagtgc ggagcaatat ggccgccttc ccatgagaaaa gacattcaag atggtgacta 2520
aatgactaaa tactttgcag agggacaaag atgggaacta gggatacggg tggaagttagt 2580
agagaagata tatgaccatc tgcataaga ggaaggataa catatgacaa atcaagatga 2640
aagaataat ccacccacc cccaccgcgt cctggccaat aagtatagcc tacatggctg 2700
ttcattatct gggacccaaa atggccacta tcttgcactcc ttccttaaag atacagaaag 2760
aattgaatcc aaggaatggg gttaggttggaa aatagaagaa aigaagggga ctctgggct 2820
aagaatactt atgtttaata ataaaagggg gaggcaaaga tgcaaaaaaaa aaaaaa 2876

<210> 2

<211> 2243

<212> DNA

<213> mouse

<400> 2

4 / 39

gagagaattt gttgcagaga gaggctccag tccagcgtgg tttgagaggc gtgcata 60
gaaagaagt ggagggaaac cagtgcacc ctaactctac gagatcttgg ggtacacaca 120
ctcggatgc tggcctccgc ctcctcggt ttcctttgtt gttcaaaagg acatgcagg 180
tggtcccggt actggatatac gggaaattca gccagtggcc agcatgaccc ccacattaag 240
cctgtggaat tggaaatgtt ggcacatgtt gaggccagg cttcgcaagc aggtctccga 300
tcacgaccag cccaaatgca cgtatggtc cccccagaag ctccccaggt actaggcggc 360
ccctctgtt ctctgggttgc tggagttcct ggaaatctga cctgtcggag tcgtgggat 420
tcccacccatg cccctgaact actgtggttc cgagatggga tccggctgga tgcgacgc 480
ttccaccaga ccacgcgtt gacaaaggcc actggaaacag tggaaaacac ctatccctg 540
accccttcca gtcatgtatgtt gggccacc ttgatctgca gagcgcgaag ccaggccctg 600
cccacaggga gggacacagc ttttacactg agcccttcaat atccccaaat ggtgactctg 660
tctgtgagc cccagactgt gcaggaggga gagaaggtaa ctttctgtt tcaagccact 720
gcccagccctc ctgtcacttgg ctacagggttgc gcgaaggggg gatccccggt gctcgggca 780
cgtggccaa gtttggaggtt cgttgcagat gccactttcc tgactgagcc ggtgtccctg 840
gaggtcagca acgcggtcgg aaggcacac cgcagcacgg cgcttggaaatgtt 900
cccattctgc aggcaaaacc taagtccgtt tccgtggacg tggggaaaga tgcctccctt 960
agctgtgtt ggcgcggaa cccacttcca cggataacctt ggacccgcattt gggggctct 1020
caggtgctga gctccggcc cacgtgcgg ctccgtccg tggcactgga ggtgcggc 1080
gactatgtat gcagggctga gccgaggaga acgggtctgg gaggcggcaa agcgcaggcg 1140
aggctgactg tgaacgcacc ccctgttagt acagccctgc aacctgcacc agcccttctg 1200
aggggtccctg ctgccttcca gtgtgtgggtt tttgcctccc ctgccccaga ctgggggtt 1260
tggtcttggg acgagggctt ctggaggca ggctcactgg gcaggttccctt agtggaaagcc 1320
ttcccaagccc cggaaatggaa gggggacag ggccctggcc ttatctgtt gctacacattt 1380
tccggaaacc accaggatccga ctttaccacc ggcttcaactt gcagtgcggc caaccggcta 1440
ggagagggac gaggccatgc ccacttggc cgttagagatt tgctgcctac tgtccggatt 1500
gtggctgggtt cagcatctgc agccacctt ctccatgg tcatcactgg agtggccctc 1560

5 / 3 9

tgctgctggc gccatggctc tctctctaag caaaagaact tggtccggat cccaggaagc 1620
 agcgagggtt ccagttcacg tggccctgag gaggagacag gcagcagtga ggaccggggt 1680
 cccattgtgc acaccgacca cagtatttgc gtttttgggg aaaaagaggc tctggagaca 1740
 aaggatccaa ccaacggttt ctacaagggtt cgaggggtca gtgtgagcct tagccttggg 1800
 gaagctcctg gaggaggcct cttcttgcca ccgcctctc cgatcggtct cccagggact 1860
 cctacttact atgacttcaa gccacatcag gacttagtcc ctccctgcag actgtacaga 1920
 gcgagggcag gttatcttac cacccccat ccccggtcct tcaccagcta catgaaaccc 1980
 acatcccttg gaccccccaga tttgagctct ggaactcccc cttcccgta tgctaccttg 2040
 tctccaccca gccaccagcg tctccagact catgtgtgaa tccatctctc caagtgaagg 2100
 gtcttggaaat ctcttgttttgc ccatatagtg ttttgtccag atttctgggg agtcagaaca 2160
 agttgtatgac caacccctcc aaaactgaac attgaaggag ggaaagatca ttacaagcat 2220
 caggactgtt ggtgtacact cag 2243

<210> 3

<211> 700

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Met Leu Ala Ser Ala Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Phe Lys Gly His

1

5

10

15

Ala Gly Ser Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp Met Val Val

20

25

30

6 / 39

Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly Ala Tyr Arg

35

40

45

Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Asp Gly Leu Ala Leu Gly Gly Glu Arg

50

55

60

Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Ala Ser

65

70

75

80

Gly Gln His Asp Leu His Ile Lys Pro Val Glu Leu Glu Asp Glu Ala

85

90

95

Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Ser Gln Ala Gly Leu Arg Ser Arg Pro Ala

100

105

110

Gln Leu His Val Met Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val Leu Gly Gly

115

120

125

Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Gly Asn Leu Thr Cys Arg

130

135

140

Ser Arg Gly Asp Ser Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp Phe Arg Asp

145

150

155

160

Gly Ile Arg Leu Asp Ala Ser Ser Phe His Gln Thr Thr Leu Lys Asp

165

170

175

7 / 3 9

Lys Ala Thr Gly Thr Val Glu Asn Thr Leu Phe Leu Thr Pro Ser Ser

180 185 190

His Asp Asp Gly Ala Thr Leu Ile Cys Arg Ala Arg Ser Gln Ala Leu

195 200 205

Pro Thr Gly Arg Asp Thr Ala Val Thr Leu Ser Leu Gln Tyr Pro Pro

210 215 220

Met Val Thr Leu Ser Ala Glu Pro Gln Thr Val Gln Glu Gly Glu Lys

225 230 235 240

Val Thr Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val Thr Gly Tyr

245 250 255

Arg Trp Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg Gly Pro Arg

260 265 270

Leu Glu Val Val Ala Asp Ala Thr Phe Leu Thr Glu Pro Val Ser Cys

275 280 285

Glu Val Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr Ala Leu Glu

290 295 300

Val Leu Tyr Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Lys Ser Val Ser Val

8 / 39

305 310 315 320

Asp Val Gly Lys Asp Ala Ser Phe Ser Cys Val Trp Arg Gly Asn Pro

325 330 335

Leu Pro Arg Ile Thr Trp Thr Arg Met Gly Gly Ser Gln Val Leu Ser

340 345 350

Ser Gly Pro Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly

355 360 365

Asp Tyr Val Cys Arg Ala Glu Pro Arg Arg Thr Gly Leu Gly Gly

370 375 380

Lys Ala Gln Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val Val Thr Ala

385 390 395 400

Leu Gln Pro Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg Leu Gln Cys

405 410 415

Val Val Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ser Val Val Trp Ser Trp Asp

420 425 430

Glu Gly Phe Leu Glu Ala Gly Ser Leu Gly Arg Phe Leu Val Glu Ala

435 440 445

9 / 3 9

Phe Pro Ala Pro Glu Val Glu Gly Gly Gln Gly Pro Gly Leu Ile Ser

450 455

460

Val Leu His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Thr Thr Gly Phe

465 470 475 480

Asn Cys Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Arg Val Gln Ile His

485

490

495

Leu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val Ala Gly Ala

500

505

510

Ala Ser Ala Ala Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Thr Gly Val Val Leu

515

520

525

Cys Cys Trp Arg His Gly Ser Leu Ser Lys Gln Lys Asn Leu Val Arg

530

535

540

Ile Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu

545

550

555

560

Thr Gly Ser Ser Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser

565

570

575

Asp Leu Val Leu Glu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr

580

585

590

1 0 / 3 9

Asn Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly

595

600

605

Glu Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ile Gly

610

615

620

Leu Pro Gly Thr Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Lys Pro His Leu Asp Leu

625

630

635

640

Val Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr

645

650

655

Pro His Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Met Lys Pro Thr Ser Phe Gly

660

665

670

Pro Pro Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Thr Leu

675

680

685

Ser Pro Pro Ser His Gln Arg Leu Gln Thr His Val

690

695

700

<210> 4

<211> 650

<212> PRT

1 1 / 3 9

<213> mouse

<400> 4

Met Leu Ala Ser Ala Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Phe Lys Gly His

1

5

10

15

Ala Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Ala Ser Gly Gln

20

25

30

His Asp Leu His Ile Lys Pro Val Glu Leu Glu Asp Glu Ala Ser Tyr

35

40

45

Glu Cys Gln Ala Ser Gln Ala Gly Leu Arg Ser Arg Pro Ala Gln Leu

50

55

60

His Val Met Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val Leu Gly Gly Pro Ser

65

70

75

80

Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Gly Asn Leu Thr Cys Arg Ser Arg

85

90

95

Gly Asp Ser Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp Phe Arg Asp Gly Ile

100

105

110

Arg Leu Asp Ala Ser Ser Phe His Gln Thr Thr Leu Lys Asp Lys Ala

115

120

125

1 2 / 3 9

Thr Gly Thr Val Glu Asn Thr Leu Phe Leu Thr Pro Ser Ser His Asp

130 135 140

Asp Gly Ala Thr Leu Ile Cys Arg Ala Arg Ser Gln Ala Leu Pro Thr

145 150 155 160

Gly Arg Asp Thr Ala Val Thr Leu Ser Leu Gln Tyr Pro Pro Met Val

165 170 175

Thr Leu Ser Ala Glu Pro Gln Thr Val Gln Glu Gly Glu Lys Val Thr

180 185 190

Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val Thr Gly Tyr Arg Trp

195 200 205

Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg Gly Pro Arg Leu Glu

210 215 220

Val Val Ala Asp Ala Thr Phe Leu Thr Glu Pro Val Ser Cys Glu Val

225 230 235 240

Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu

245 250 255

Tyr Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Lys Ser Val Ser Val Asp Val

1 3 / 3 9

260

265

270

Gly Lys Asp Ala Ser Phe Ser Cys Val Trp Arg Gly Asn Pro Leu Pro

275

280

285

Arg Ile Thr Trp Thr Arg Met Gly Gly Ser Gln Val Leu Ser Ser Gly

290

295

300

Pro Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly Asp Tyr

305

310

315

320

Val Cys Arg Ala Glu Pro Arg Arg Thr Gly Leu Gly Gly Lys Ala

325

330

335

Gln Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val Val Thr Ala Leu Gln

340

345

350

Pro Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val

355

360

365

Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ser Val Val Trp Ser Trp Asp Glu Gly

370

375

380

Phe Leu Glu Ala Gly Ser Leu Gly Arg Phe Leu Val Glu Ala Phe Pro

385

390

395

400

1 4 / 3 9

Ala Pro Glu Val Glu Gly Gly Gln Gly Pro Gly Leu Ile Ser Val Leu
405 410 415

His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Thr Thr Gly Phe Asn Cys
420 425 430

Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Arg Val Gln Ile His Leu Gly
435 440 445

Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val Ala Gly Ala Ala Ser
450 455 460

Ala Ala Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Thr Gly Val Val Leu Cys Cys
465 470 475 480

Trp Arg His Gly Ser Leu Ser Lys Gln Lys Asn Leu Val Arg Ile Pro
485 490 495

Gly Ser Ser Glu Gly Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Thr Gly
500 505 510

Ser Ser Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp Leu
515 520 525

Val Leu Glu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn Gly
530 535 540

1 5 / 3 9

Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu Ala

545 550 555 560

Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ile Gly Leu Pro

565 570 575

Gly Thr Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Lys Pro His Gln Asp Leu Val Pro

580 585 590

Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro His

595 600 605

Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Met Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro Pro

610 615 620

Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Thr Leu Ser Pro

625 630 635 640

Pro Ser His Gln Arg Leu Gln Thr His Val

645 650

<210> 5

<211> 2980

<212> DNA

〈213〉 *Homo sapiens*

〈400〉 5

cccagagacc caggccgcgg aactggcagg cgtttcagag cgtcagaggc tgcggatgag 60
cagacttggc ggactccagg ccagagacta ggctgggcga agagtcgagc gtgaaggggg 120
ctccgggcca gggtgacagg aggctgtgtt gagaggaaga agttgacggg aaggccatgt 180
cgacggcaaa tctcgtaac cttggggac gaatgttcag gatgcgggtc ccccccctcc 240
tcgtccctctt ctctgtcttc agagggagag caggcccgtc gccccatitc ctgcaacagc 300
cagaggacct ggtggtgctg ctgggggagg aagcccgct gccgtgtgct ctggcgccct 360
actggggct agttcagttgg actaagagtg ggctggccct agggggccaa agggacctac 420
cagggtggtc ccggtaactgg atatcaggga atgcagccaa tggccagcat gacctccaca 480
ttaggccccgtt ggagcttagag gatgaagcat catatgaatg tcaggctaca caagcaggcc 540
tccgctccagg accagcccaa ctgcacgtgc tggcccccc agaagcccc cagggtgtgg 600
gcggccccc tgggtctctg gttgtggag ttccctgcgaa cctgacatgt cggagccgtg 660
gggatccccg ccctaccctt gaattgttgtt ggttccgaga tgggtccctg ttggatggag 720
ccaccccttcca tcaagaccctg ctgaaggaag ggacccctgg gtcaaggagag agcaccttaa 780
ccctgacccc ttccat gatgtggag ccacctttgt ctgcccggcc cggagccagg 840
ccctgcccac aggaagagac acagctatca cactgagcct gcagttcccc ccagaggtaa 900
ctctgtctgc ttccat gatgtggag ccacctttgt ctgcccggcc cggagccagg 960
ccacagccca gcctctgtc acaggctaca ggtggcaaa agggggctct ccgggtgtgg 1020
gggccccgg gccaagggtt gagggtgtgg cagacccctc gttcttgact gagcccggt 1080
cctgcgaggt cagcaacgcc gtgggttagcg ccaaccgcag tactgcgttg gatgtgttgt 1140
ttggccgat tctgcaggca aagccggagc ccgtgtccgt ggacgtgggg gaagacgtt 1200
ccttcagctg cgcctggcgc gggaaaccgc ttccacgggt aacctggacc cggccgggtg 1260
gcgcgcaggt gctggcctt ggagccacac tgcgtcttcc gtcgggtgggg cccgaggacg 1320
caggcgacta tgggtgcaga gctgaggctg ggctatcggtt cttgcggggc ggcggccgg 1380

17 / 39

aggctcggt gactgtgaac gctcccccag tagtgaccgc cctgactct gcgcctgcct 1440
tcctgagggg ccctgctcgc ctccagtgac tggtttcgc ctctccgc ccagatgccc 1500
tggctgtgtc ttggatgag ggcttctgg aggccccgtc gcagggccgg tccctgg 1560
agacattccc tgccccagag agccgcgggg gactgggtcc gggctgatc tctgtgctac 1620
acatttcggg gacccaggag tctgactta gcaggagctt taactgcagt gcccgaaacc 1680
ggctggcga gggaggtgcc caggccagcc tggcccttag agacttgctg cccactgtgc 1740
ggatagtggc cggagtgcc gctgccacca caactctctt taiggtcatc actgggtgg 1800
ccctctgtc ctggcgccac agcaaggctt cagccctttt ctccgagcaa aagaacctga 1860
tgcgaatccc tggcagcagc gacggctcca gttcacgagg tcctgaagaa gaggagacag 1920
gcagccgca ggaccggggc cccatgtgc acactgacca cagtatctg gttctggagg 1980
agaaaggac tctggagacc aaggacccaa ccaacggta ctacaaggta cgaggagtca 2040
gtgtgagcct gagecttggc gaagccctg gaggaggctt ctccctgcca ccaccctccc 2100
cccttggcc cccagggacc cctaccttct atgacttcaa cccacacctg ggcattggcc 2160
ccccctgcag actttacaga gccagggcag gctatctcac cacacccac cctcgagctt 2220
tcaccagta catcaaacc acatccttgc ggccccaga tctggccccc gggactcccc 2280
ccttccata tgctgccttc cccacacca gccacccgctc tctccagact cacgtgtac 2340
atctttccaa tggaaagatc ctggatctc caacttgcca taatggatttgc ttttgatttc 2400
tgagggcaca ggacaagttt ggcaccccttac tcctccaaaa ctgaacacaa ggggaggaa 2460
agatcattac atttgtcagg agcatttgtt tacagttcgc tcagccaaag gagatgcccc 2520
aagtgggagc aacatggcca cccaaatatgc ccacctattt cccgggttaa aagagattca 2580
agatggcagg taggcccattt gaggagagat gggacaggg cagtgggtgt tggagtttgc 2640
ggggccggat ggaagtttt tctagccact gaaagaagat atttcaagat gaccatctgc 2700
attgagagga aaggttagcat aggatagatg aagatgaaga gcataccagg cccacccctg 2760
gctctccctg agggaaactt tgcctggcca atggaaatgc agccaagatg gccatataact 2820
cccttaggaac ccaagatggc caccatcttgc attttactttt ccttaaagac tcagaaagac 2880
ttggacccaa ggagtgggaa tacagtgaga attaccactg tggggcaaa atattggat 2940

1 8 / 3 9

aaaaatat tttt atgttaata ataaaaaaaaa gtcaaaggagg 2980

<210> 6

<211> 708

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe

1

5

10

15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp

20

25

30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly

35

40

45

Ala Tyr Trp Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Ser Gly Leu Ala Leu Gly

50

55

60

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn

65

70

75

80

Ala Ala Asn Gly Gln His Asp Leu His Ile Arg Pro Val Glu Leu Glu

85

90

95

1 9 / 3 9

Asp Glu Ala Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Thr Gln Ala Gly Leu Arg Ser

100 105 110

Arg Pro Ala Gln Leu His Val Leu Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val

115 120 125

Leu Gly Gly Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Asn Leu

130 135 140

Thr Cys Arg Ser Arg Gly Asp Ala Arg Pro Thr Pro Glu Leu Leu Trp

145 150 155 160

Phe Arg Asp Gly Val Leu Leu Asp Gly Ala Thr Phe His Gln Thr Leu

165 170 175

Leu Lys Glu Gly Thr Pro Gly Ser Val Glu Ser Thr Leu Thr Leu Thr

180 185 190

Pro Phe Ser His Asp Asp Gly Ala Thr Phe Val Cys Arg Ala Arg Ser

195 200 205

Gln Ala Leu Pro Thr Gly Arg Asp Thr Ala Ile Thr Leu Ser Leu Gln

210 215 220

Tyr Pro Pro Glu Val Thr Leu Ser Ala Ser Pro His Thr Val Gln Glu

2 0 / 3 9

225 230 235 240

Gly Glu Lys Val Ile Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val

245 250 255

Thr Gly Tyr Arg Trp Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg

260 265 270

Gly Pro Arg Leu Glu Val Val Ala Asp Ala Ser Phe Leu Thr Glu Pro

275 280 285

Val Ser Cys Glu Val Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr

290 295 300

Ala Leu Asp Val Leu Phe Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Glu Pro

305 310 315 320

Val Ser Val Asp Val Gly Glu Asp Ala Ser Phe Ser Cys Ala Trp Arg

325 330 335

Gly Asn Pro Leu Pro Arg Val Thr Trp Thr Arg Arg Gly Gly Ala Gln

340 345 350

Val Leu Gly Ser Gly Ala Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Gly Pro Glu

355 360 365

21 / 39

Asp Ala Gly Asp Tyr Val Cys Arg Ala Glu Ala Gly Leu Ser Gly Leu

370 375 380

Arg Gly Gly Ala Ala Glu Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val

385 390 395 400

Val Thr Ala Leu His Ser Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg

405 410 415

Leu Gln Cys Leu Val Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ala Val Val Trp

420 425 430

Ser Trp Asp Glu Gly Phe Leu Glu Ala Gly Ser Gln Gly Arg Phe Leu

435 440 445

Val Glu Thr Phe Pro Ala Pro Glu Ser Arg Gly Gly Leu Gly Pro Gly

450 455 460

Leu Ile Ser Val Leu His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Ser

465 470 475 480

Arg Ser Phe Asn Cys Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Ala

485 490 495

Gln Ala Ser Leu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val

500 505 510

2 2 / 3 9

Ala Gly Val Ala Ala Ala Thr Thr Thr Leu Leu Met Val Ile Thr Gly

515

520

525

Val Ala Leu Cys Cys Trp Arg His Ser Lys Ala Ser Ala Ser Phe Ser

530

535

540

Glu Gln Lys Asn Leu Met Arg Ile Pro Gly Ser Ser Asp Gly Ser Ser

545

550

555

560

Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Glu Thr Gly Ser Arg Glu Asp Arg Gly

565

570

575

Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp Leu Val Leu Glu Glu Lys Gly

580

585

590

Thr Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly

595

600

605

Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe

610

615

620

Leu Pro Pro Pro Ser Pro Leu Gly Pro Pro Gly Thr Pro Thr Phe Tyr

625

630

635

640

Asp Phe Asn Pro His Leu Gly Met Val Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg

2 3 / 3 9

645

650

655

Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro His Pro Arg Ala Phe Thr Ser

660

665

670

Tyr Ile Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr

675

680

685

Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Ala Phe Pro Thr Pro Ser His Pro Arg Leu

690

695

700

Gln Thr His Val

705

<210> 7

<211> 2976

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gggaactggc aggcgtttca gagcgtcaga ggctgcggat gagcagactt ggaggactcc 60
aggccagaga ctaggctggg cgaagagtgcg agcgtgaagg gggctccggg ccagggtgac 120
aggaggcgtg cttgagagga agaagtgcac ggaaaggcca gtgcgacggc aaatctcgtg 180
aaccttgggg gacgaatgct caggatgcgg gtccccgccc tcctcgctt cctcttctgc 240
ttcagaggga gagcaggccc gtcgccccat ttccctgcaac agccagagga cctgggtgg 300

24 / 39

ctgctgggg aggaagcccg gctgccgtgt gctctggcg cctactgggg gctagttcag 360
tggactaaga gtgggtggc cctagggggc caaaggacc taccagggtg gtcccggtac 420
tggatatcag ggaatgcagc caatggccag catgaccctcc acattaggcc cgtggagcta 480
gaggatgaag catcatatga atgtcaggct acacaagcag gcctccgctc cagaccagcc 540
caactgcacg tgctggtccc cccagaagcc ccccagggtgc tggcggccc ctctgtgtct 600
ctggttgtcgt gagttccgtgc gaacctgaca tgtcggagcc gtggggatgc ccgcctcgcc 660
cctgaatitgc tgtggttccg agatgggtc ctgttggatg gagccacctt ccatcagacc 720
ctgctgaagg aagggacccc tgggtcagtg gagagcacct taaccctgac cccctttcag 780
ccatgatgtatggccaccc ttgtctgccc ggcccggagc caggccctgc ccacaggaag 840
agacacagct atcacactga gcctgcagta ccccccagag gtgactctgt ctgtttcgcc 900
acacactgtg caggagggag agaaggcat tttccgtgc caggccacag cccagccctcc 960
tgtcacaggc tacaggtggg caaaaggggg ctctccgggtg ctggggccc gcgggccaag 1020
gttagaggtc gtggcagacg cctcggttc gactgagccc gtgtctgtcg aggtcagcaa 1080
cgccgtgggt agcgccaacc gcagtaatgc gctggatgtg ctgttggc cgattctgca 1140
ggcaaagccg gagcccggtt ccgtggacgt ggggaaagac gcttccttca gctgcgcctg 1200
gcgcgggaac ccgtttccac gggtaaccgt gacccggccgc ggtggcgcgc aggtgttggg 1260
ctctggagcc acactgcgtc ttccgtcggt gggcccgag gacgcaggcg actatgtgtg 1320
cagagctgag gctggctat cggccgtgcg gggcggcgcc gcggaggctc ggctgactgt 1380
gaacgttccc ccagtagtga ccgcctgca ctctgcgcct gccttcctiga gggccctgc 1440
tcgcctccag tgtctggtt tcgccttc cgcggcagat ggcgtggct ggtcttggga 1500
tgagggcttc ctggaggcgg ggtcgccaggc ccgggttcgt gtggagacat tccctgcccc 1560
agagagccgc gggggactgg gtccggccct gatctctgtg ctacacatit cggggaccca 1620
ggagctgtac tttagcagga gctttaactg cagtgcggg aaccggctgg gcgagggagg 1680
tgcccaggcc agccgtggcc gttagagactt gctgcccact gtgcggatag tggccggagt 1740
ggccgcgtgcc accacaactc tccttatggt catcaactggg gtggccctct gctgtggcg 1800
ccacagcaag gcctcagcc ttttcgtcgaa gcaaaagaac ctgtatgcgaa tccctggcag 1860

25 / 39

cagcgacggc tccagttcac gaggccctga agaagaggag acaggcagcc gcgaggaccg 1920
gggccccatt gtgcacactg accacagtga tctggttctg gaggaggaag ggactctgga 1980
gaccaaggac ccaaccaacg gttactacaa ggtccgagga gtcagtgtga gcctgagcct 2040
tggcgaagcc cctggaggag gtcctttctt gccaccaccc tcccccttg ggcccccagg 2100
gacccttacc ttctatgact tcaacccaca cctggcatg gtccttttttgcagacttta 2160
cagagccagg gcaggctatc tcaccacacc ccaccctcga gctttcacca gctacatcaa 2220
acccacatcc ttgggcccc cagatctggc cccggact ccccttcc cataatgtgc 2280
cttccccaca cctagccacc cgctctcca gactcacgtg tgacatctt ccaatggaag 2340
agtccctggga tctccaaactt gccatctgg attgttctga ttctgagga gccaggacaa 2400
gttggcgacc ttactcctcc aaaactgaac acaaggggag gaaaagatca ttacatttgt 2460
caggagcatt tgtatacagt cagctcagcc aaaggagatg ccccaagtgg gagcaacatg 2520
gccacccaaat atgcccaccc attccccgtt gtaaaagaga ttcaagatgg caggtaggcc 2580
ctttagggag agatggggac agggcagtgg gtgttgggag ttggggccg ggatggaagt 2640
tgtttcttagc cactgaaaga agatatttca agatgaccat ctgcatttag aggaaaggta 2700
gcataggata gatgaagatg aagagcatac caggccccac cctggcttc cctgagggga 2760
actttgtcg gccaatggaa atgcagccaa gatggccata tactccctag gaacccaaga 2820
tggccaccat ctgatttttta ctttccttaa agacacagaa agacttggac ccaaggagtg 2880
gggatacagt gagaattacc actgttgggg caaaatatttggataaaaat atttatgttt 2940
aataataaaa aaaagtcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2976

<210> 8

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

26 / 39

<400> 8

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe

1

5

10

15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp

20

25

30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly

35

40

45

Ala Tyr Trp Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Ser Gly Leu Ala Leu Gly

50

55

60

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn

65

70

75

80

Ala Ala Asn Gly Gln His Asp Leu His Ile Arg Pro Val Glu Leu Glu

85

90

95

Asp Glu Ala Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Thr Gln Ala Gly Leu Arg Ser

100

105

110

Arg Pro Ala Gln Leu His Val Leu Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val

115

120

125

Leu Gly Gly Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Asn Leu

27 / 39

130 135 140

Thr Cys Arg Ser Arg Gly Asp Ala Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp

145 150 155 160

Phe Arg Asp Gly Val Leu Leu Asp Gly Ala Thr Phe His Gln Thr Leu

165 170 175

Leu Lys Glu Gly Thr Pro Gly Ser Val Glu Ser Thr Leu Thr Leu Thr

180 185 190

Pro Phe Gln Pro

195

<210> 9

<211> 1532

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

cccaagagacc caggccgcgg aactggcagg cgtttcagag cgtcagagggc tgcggatgag 60
cagacttggc ggactccagg ccagagacta ggctgggcga agagtcgagc gtgaaggggg 120
ctccgggcca gggtgacagg aggcgtgcit gagaggaaga agttgacggg aaggccagtg 180
cgacggcaaa tctcgtaac cttggggac gaatgctcag gatgcgggtc cccgccctcc 240
tcgtccctct cttctgcttc agagggagag caggcccgtc gccccatttc ctgcaacagc 300

28 / 39

cagaggacct gggtggctg ctggcgagg gaggtgccca ggccagcctg ggccgttagag 360
cctcagcctc ttctccgag caaaagaacc ttagtgcgaat ccctggcagc agcgacggct 420
ccagttcacg aggtcctgaa gaagaggaga caggcagccg cgaggaccgg ggccccattg 480
tgcacactga ccacagtgtat ctggttctgg aggaggaagg gactctggag accaaggacc 540
caaccaacgg ttactacaag gtccgaggag tcagtgtgag cctgagcctt ggcgaagccc 600
ctggaggagg tctttccctg ccaccaccc ccccccattg gcccccaggg acccctaccc 660
tctatgactt caacccacac ctggcatgg tccccccctg cagactttac agagccaggg 720
caggctctt caccacaccc caccctcgag ctttaccatg ctacatcaaa cccacatcc 780
ttggggccccc agatctggcc cccgggactc ccccttccc atatgctgcc ttccccacac 840
ctagccaccc gcgtctccag actcacgtgt gacatcttc caatggaaga gtccctggat 900
ctccaacttg ccataatgga ttgttctgat ttctgaggag ccaggacaag ttggcgacct 960
tactcctcca aaactgaaca caagggagg gaaagatcat tacatttgtc aggagcattt 1020
gtatacagtc agctcagcca aaggagatgc cccaagtggg agcaacatgg ccacccaata 1080
tgcccaccta ttccccggtg taaaagagat tcaagatggc aggttaggccc ttgaggaga 1140
gatggggaca gggcagtggg tttgggagt ttggggccgg gatggaagtt gtttctagcc 1200
actgaaagaa gatatttcaa gatgaccatc tgcattgaga ggaaaggtag cataggatag 1260
atgaagatga agagcatacc agggccacc ctggctctcc ctgaggggaa ctttgctcgg 1320
ccaatggaaa tgcagccaag atggccatat actccctagg aacccaagat ggccaccatc 1380
ttgatttac ttccctaaa gactcagaaa gacttggacc caaggagttgg ggatacagtg 1440
agaattacca ctgttgggc aaaatattgg gataaaaata ttatgttta ataataaaaa 1500
aaagtcaaag aggcaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1532

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

2 9 / 3 9

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe
1 5 10 15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Gly Gly Ala Gln Ala Ser Leu Gly Arg
35 40 45

Arg Ala Ser Ala Ser Phe Ser Glu Gln Lys Asn Leu Met Arg Ile Pro
50 55 60

Gly Ser Ser Asp Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Glu Thr
65 70 75 80

Gly Ser Arg Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp
85 90 95

Leu Val Leu Glu Glu Glu Gly Thr Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn
100 105 110

Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu
115 120 125

30 / 39

Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Leu Gly Pro

130

135

140

Pro Gly Thr Pro Thr Phe Tyr Asp Phe Asn Pro His Leu Gly Met Val

145

150

155

160

Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro

165

170

175

His Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Ile Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro

180

185

190

Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Ala Phe Pro

195

200

205

Thr Pro Ser His Pro Arg Leu Gln Thr His Val

210

215

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 1 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 11

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 12

acggaatgat gt

12

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 2 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 13

gtccatcttc tctctgagac tctggc

26

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 14

accagagtct ca

12

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

33 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 15

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 16

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 16

acacactcac ag

12

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 4 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 17

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 18

actgtcacac tg

12

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 5 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 19

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 20

acgatcgaca gt

12

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 6 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 21

ggctttacac ttatgcttc cggctc 26

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 22

cagctatgac catgattacg ccaagc 26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 7 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 23

aggcgattaa gttggtaac gccagg

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 24

ccagtcacga cgttgtaaaa cgacgg

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 8 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 25

cttcccgat gctaccttgt ctccac

26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 26

tccatctctc caagtgaagg gtcttg

26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 9 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 27

ccaacagtc tgcatgttg taatga 26

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 28

tccttcaatg ttcatgttttg gagggg 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9423754 A1 (The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services), 27 October, 1994 (27.10.94), & AU 9465312 A & EP 696205 A1 & JP 8-509215 A & US 5690927 A & US 5869463 A & DE 69429721 E & US 2002/0110546 A1	10-12/1-9
X	KORDOWER, J.H. et al., Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease, N. Engl. J. Med., 1995, Vol. 332, No. 17, pages 1118 to 1124	10-12/1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2003 (10.11.03)

Date of mailing of the international search report
25 November, 2003 (25.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13420

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuhiro SAKURADA et al., "Seitai Shinkei Kansaibo Bunka no Bunshi Mechanism", Cell Technology, 2000, Vol.19, No.3, pages 398 to 405	10-12/1-9
X	Kazuhiro SAKURADA et al., "Seitai Shinkei Kansaibo o Hyoteki to shita Saisei Iryo", The Tissue Culture Engineering, 2000, Vol.26, No.8, pages 303 to 306	10-12/1-90
P,X	US 2003/0036150 A1 (GENETIC INC.), 20 February, 2003 (20.02.03), PRO#292 (Family: none)	5-7
A	LISITSYN, N.A. et al., Representational difference analysis: finding the differences between genomes, Trends Genet, 1995, Vol.11, No.8, pages 303 to 307	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C 1. 7 C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C 1. 7 C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE(STN), JSTplus/JST7580(JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 9423754 A1 (The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services) 1994.10.27 & AU 9465312 A & EP 696205 A1 & JP 8-509215 A & US 5690927 A & US 5869463 A & DE 69429721 E & US 2002/0110546 A1	10-12/1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.11.03

国際調査報告の発送日 25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
七條 里美

印

4 B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	KORDOWER, J. H. et al., Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease, N Engl J Med, 1995, Vol. 332, No. 17, pp. 1118-1124	10-12/1-9
X	桜田一洋他, 成体神経幹細胞分化の分子メカニズム, 細胞工学, 2000, Vol. 19, No. 3, pp. 398-405	10-12/1-9
X	桜田一洋, 成体神経幹細胞を標的とした再生医療, 組織培養工学, 2000, Vol. 26, No. 8, pp. 303-306	10-12/1-90
PX	US 2003/0036150 A1 (GENETIC INC) 2003. 02. 20 PRO#292 (ファミリーなし)	5-7
A	LISITSYN, N. A. et al., Representational difference analysis: finding the differences between genomes, Trends Genet, 1995, Vol. 11, No. 8, pp. 303-307	1-12